

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

**INDUÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS MUSCULARES
LISAS PELA QUIESCINA SULFIDRIL OXIDASE 1 (QSOX1)**

CURITIBA

2014

BEATRIZ ESSENFELDER BORGES

**INDUÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS MUSCULARES
LISAS PELA QUIESCINA SULFIDRIL OXIDASE 1 (QSOX1)**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Lia Sumie Nakao

CURITIBA

2014

“O homem que deseja ser cientista e à ciência dedicar todo seu tempo e amor tem pelo menos três certezas: a de que morrerá um dia (como todo mundo), a de que não ficará rico (como quase todo mundo) e a de que se divertirá muito (como poucos)”.

Newton Freire Maia

AGRADECIMENTOS

Em especial a minha orientadora Lia Sumie Nakao pela amizade, confiança, vivência e ensinamento nestes anos de trabalho.

Aos professores e orientadores Silvio Marques Zanata e Adriana Mercadante pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Aos meus pais, José Borges Neto e Cléa Mara Essenfelder Borges, que fizeram o possível e o impossível para que um dia eu me tornasse uma profissional e, finalmente, pudesse dar os meus primeiros passos, depois de tantos tombos. Acho que agora realmente sei o que quero fazer da minha vida.

A minha irmã que primeiramente me incentivou a fazer Biologia e me mostrou como é legal ser Bióloga e professora. Depois pela parceria durante essa fase longa e difícil. Pode contar comigo, pois agora quem vai passar por isso será você!

Em especial agradeço ao meu marido Carlos Henrique Marques de Miranda, mais conhecido como Kacco, pela imensa paciência quando dava chiliques porque o computador ou a internet não funcionavam, quando ligava desesperada dizendo que não conseguia usar um programa, quando perdia a paciência por qualquer coisa, ou seja, agradeço ter sobrevivido a essa fase tão intensa e prolongada das nossas vidas. Sem sua ajuda e incentivo não teria conseguido.

Aos meus amigos, que tive a sorte de poder escolher e que carregarei por toda a vida, agradeço imensamente.

Aos amigos e colegas do laboratório de Neurobiologia e Patologia Redox, em especial Letícia, Carol, Luiz, Sze, Ivanna, Zaine, Ingrid pelas discussões científicas e não científicas que deixaram os dias de trabalho muito mais divertidos. E todos aqueles que de alguma forma me auxiliaram para a realização desse trabalho.

Aos alunos do laboratório de Matriz Extracelular, pela grande ajuda e empréstimos além de muitas risadas em momentos especiais. Agradeço de coração a Mari Bóia, Aline, Fernando, Gabriel, Adriano, Val, Thiago, Ale e a Olga.

Agradeço imensamente a Marcia Helena Appel por tudo!!! Pela amizade, ajuda nos experimentos, discussões científicas, discussões não científicas, companheirismo, pelos cafés com empadão delicioso. Resumindo, MUITO OBRIGADA MESMO!

Ao Axel Helmut Cofré pela paciência e determinação para terminarmos tudo o que estávamos fazendo, mesmo não estando mais no laboratório sempre estava presente em todas as dificuldades.

A Chelin pelo companheirismo e amizade durante esses quatro anos de muito trabalho. Se não fosse você, Marcia e Axel eu ainda acharia que a QSOX não existe!! Obrigada por me auxiliar nesse mundo protéico que é uma loucura....

Agradeço a Dilza Trevisan, pela amizade sincera e parceria em tantos momentos difíceis. Parceiro é parceiro!!! Obrigada de coração!

Agradeço a Camila Marques pela amizade e muitas risadas durante esse trabalho. Obrigada pelo incentivo e oportunidades que me apresentou fazendo com que pudesse crescer como profissional.

Agradeço a todos aqueles que me encontravam no corredor e me incentivavam a continuar e persistir como a Katya Naliwaiko, Silvio Sanches, Giseli Klassen, Edilene Alcantara e tantos outros.

Aos meus amigos do folclore que sempre entenderam quando não podia ir aos ensaios, pois precisava fazer experimentos nos finais de semana.

Aos meus amigos das Faculdades Integradas Santa Cruz de Curitiba que acompanharam toda essa caminhada e nunca permitiram que eu desistisse. Meu muito obrigada!

Ao programa de Pós- Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pela bolsa concedida (CAPES) e ao INCT *Redoxoma* - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Processos Redox em Biomedicina, pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira me apoiaram para terminar esse trabalho. Muito Obrigada!!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
<i>FIGURAS DA TESE:</i>	<i>XI</i>
<i>FIGURAS DO ARTIGO:.....</i>	<i>XII</i>
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>PROTEÍNA QSOX</i>	<i>1</i>
1.2 <i>QSOX1 EM SITUAÇÕES PATOLÓGICAS</i>	<i>7</i>
1.3 <i>ATEROSCLEROSE E REESTENOSE</i>	<i>8</i>
1.4 <i>PROLIFERAÇÃO CELULAR.....</i>	<i>13</i>
2. OBJETIVOS	17
2.1 <i>OBJETIVO GERAL.....</i>	<i>17</i>
2.2 <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	<i>17</i>
3. ARTIGO SUBMETIDO	18
<i>THE EXTRACELLULAR FLAVO-OXIDASE QSOX1 SUPPORTS VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELL MIGRATION</i> <i>AND PROLIFERATION: EVIDENCE FOR A ROLE IN NEOINTIMA GROWTH</i>	<i>18</i>
<i>ABSTRACT.....</i>	<i>19</i>
<i>Highlights:</i>	<i>19</i>
<i>INTRODUCTION.....</i>	<i>20</i>
<i>MATERIAL AND METHODS.....</i>	<i>22</i>
<i>RESULTS.....</i>	<i>28</i>
<i>DISCUSSION</i>	<i>32</i>
<i>REFERENCES.....</i>	<i>35</i>
<i>FIGURES.....</i>	<i>41</i>
4. RESULTADOS OBTIDOS APÓS ARTIGO	52
4.1 <i>MATERIAIS E MÉTODOS</i>	<i>52</i>
4.1.1 <i>Purificação das recombinantes em coluna de afinidade por LPS.....</i>	<i>52</i>
4.1.2 <i>Atividade enzimáticas das proteínas recombinantes.....</i>	<i>52</i>
4.1.3 <i>Ensaio de proliferação determinado pelo método de Cristal Violeta</i>	<i>53</i>
4.2 <i>RESULTADOS</i>	<i>53</i>
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
6. CONCLUSÕES.....	62
7. REFERÊNCIAS.....	63
8. ANEXO – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO	71

8.1 <i>DE NOVO</i> GALECTIN-3 EXPRESSION INFLUENCES THE RESPONSE OF MELANOMA CELLS TO ISATIN-SCHIFF BASE COPPER (II) COMPLEX-INDUCED OXIDATIVE STIMULUS.	71
8.2 ANTIOXIDANT PROPERTIES OF GLUTAMINE AND ITS ROLE IN VEGF-AKT PATHWAYS IN PORTAL HYPERTENSION GASTROPATHY.	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ALR	<i>Augmenter of Liver Regeneration</i>
BFA	<i>Brefeldin A</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
Cat	Catalase
CDKs	Cinases Dependentes de Ciclina
DMEM	<i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
ECM	Matriz extracelular
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
Ero	<i>Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1</i>
Erv	<i>Essencial for Respiration and Viability</i>
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GSH	Glutathiona reduzida
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HVA	<i>Homovanillic acid</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IL-1	Interleucina 1
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kDa	kilo Dalton
LB	Meio Luria-Bertani
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
MMP	Metaloprotease
mQSOX1	Proteína recombinante selvagem para QSOX
mQSOX1C452S	Proteína recombinante com mutação sitio dirigida
PAI-1	<i>Plasminogênio ativador inibidor-1</i>
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i>

PCNA	<i>Proliferation-Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDI	Proteína Dissulfeto Isomerase
Peg-cat	Polietilenoglicol catalase
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
QSOX	Quiescina/ sulfidril oxidase
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
ROS	<i>Reatives oxygen species</i>
RTK	<i>Receptor tyrosine kinases</i>
S	Aminoácido serina
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino
siRNA	<i>Small interference RNA</i>
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TBST	Tampão salina tamponada com Tris contendo Tween-20
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TRX	Tiorredoxina
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VSMC	<i>Vascular Smooth Muscle Cells</i>

LISTA DE FIGURAS

Figuras da Tese:

Figura 1:	Esquema demonstrativo dos domínios estruturais da QSOX.....	3
Figura 2:	Esquema demonstrativo de QSOX1 com suas duas isoformas.....	4
Figura 3:	Esquema demonstrativo de QSOX2.....	4
Figura 4:	Intensidade de expressão das isoformas de QSOX.....	6
Figura 5:	Esquema representativo das divisões histológicas da artéria normal.....	9
Figura 6:	Representação do processo de aterosclerose.....	10
Figura 7:	Artéria carótida de rato 14 dias após lesão arterial, com neoíntima proeminente.....	12
Figura 8:	Esquema do ciclo celular.....	14
Figura 9:	Esquema com as fases do ciclo celular e regulação pelas ciclinas-CDKs.....	15
Figura 10:	Células VSMC não carenciadas e tratadas com 5 e 50 nM de recombinantes.....	54
Figura 11:	Representação gráfica da produção de H ₂ O ₂ pela oxidação de DTT pelas enzimas mQSOX1 e mQSOX1C452S.....	55
Figura 12:	Células VSMC carenciadas com 0,1% de SFB por 24 horas e tratadas com 5 e 50 nM de recombinantes.....	56
Figura 13:	Células VSMC carenciadas com 0,1% de SFB por 24 horas e tratadas com 5 e 50 nM de recombinantes.....	57
Figura 14:	Células VSMC tratadas com 5 e 50 nM de recombinates e Peg-cat e cat.....	58

Figuras do Artigo:

Figure 1:	Effects of QSOX1 knockdown and overexpression on VSMC.....	41
Figure 2:	Effects of QSOX1 knockdown and overexpression in VSMC migration.....	42
Figure 3:	Effect of exogenous extracellular recombinant QSOX1 in VSMC migration.....	43
Figure 4:	Effect of QSOX1 knockdown and overexpression in proliferative events in VSMC.....	44
Figure 5:	Effect of exogenous extracellular recombinant QSOX1 in VSMC proliferation.....	45
Figure 6:	QSOX1 expression and quantification in rat carotids after balloon catheter injury.....	46
Figure 7:	QSOX1 expression in neointima after <i>in vivo</i> siRNA transfection in rat carotids.....	47
Figure 8:	Effect of QSOX1 knockdown on the neointima/media area ratio.....	48
Figure 9:	Effect of QSOX1 knockdown on PCNA expression in the neointima	49
Suple 1:	Neointimal hyperplasia after injury by balloon catheter in rat carotids.....	50
Suple 2:	Efficiency of <i>in vivo</i> transfection with pluronic gel.....	51

RESUMO

Quiescin sulfidril oxidase 1 é uma flavoenzima que pode estar presente no meio extracelular cujas funções e substratos fisiológicos neste ambiente não são bem conhecidos. QSOX1 tem sido demonstrada na regulação da sobrevivência de células tumorais, proliferação e migração, além da remodelação da matriz extracelular (ECM). No entanto, ainda não estão relatados dados sobre a QSOX1 em outras condições fisiopatológicas. A reestenose é uma consequência da lesão arterial e que acomete cerca de 30% dos pacientes que sofreram angioplastia por cateter-balão. O modelo experimental em carótidas de rato reproduz o processo fisiopatológico que ocorre em humanos, levando à formação da neoíntima. Esta nova camada ocorre devido à migração e proliferação de células do músculo liso vascular (VSMC) da túnica média para a túnica íntima, seguido pela síntese e remodelação de ECM. Nosso trabalho mostra que a menor expressão e síntese de QSOX1, obtida por siRNA, diminui a migração e a proliferação de células musculares lisas em cultura, como determinado por ensaios de *scratch* ou migração em *transwell* e de cristal violeta, respectivamente. Em contrapartida, a superexpressão de QSOX1, obtida com o vetor pCR QSOX1-pCR3.1, estimula esses processos neste modelo. Além disso, a atividade sulfidril oxidase no meio extracelular parece mediar a migração, mas não a proliferação, como mostrado em ensaios de incubação das VSMC com QSOX1 recombinante de camundongo ativa ou inativada pela substituição da cisteína 452 por serina. A proliferação celular induzida pelas QSOX1 recombinantes ativa e inativa foi similar, induziu a expressão da proteína PCNA e não foi dependente de peróxido de hidrogênio intracelular ou extracelular, uma vez que a proliferação não foi afetada pela co-incubação das células com as proteínas recombinantes e catalase ou PEG-catalase. O papel da QSOX1 *in vivo* foi também analisada. A neoíntima formada após lesão arterial em carótidas de ratos mostrou-se imunomarcada com QSOX1 principalmente 14 dias após a lesão. A inibição da expressão da QSOX1 por siRNA no tecido arterial levou a uma diminuição significativa na expressão do PCNA em 14 dias pós-lesão e uma razão de área íntima/média diminuída no dia 21 pós-lesão, em comparação com os controles *sham*. Em resumo, os nossos resultados demonstram que QSOX1 extracelular induz células do músculo liso vascular (VSMC) à migração e proliferação. Interessantemente a proliferação não depende da atividade sulfidril oxidase da enzima e *in vivo* contribui para a formação da neoíntima em artérias carótidas de ratos lesadas por cateter balão.

ABSTRACT

Quiescin sulfhydryl oxidase is a flavoenzyme largely present in the extracellular milieu whose physiological functions and substrates are not known. QSOX1 has been implicated in the regulation of tumor cell survival, proliferation and migration, in addition to extracellular matrix (ECM) remodeling. However, data regarding other pathophysiological conditions are still lacking. Restenosis is a consequence of arterial injury, and affects about 30 % of patients who underwent angioplasty. The experimental rat carotid model reproduces the physiological process that occurs in humans, leading to neointima formation. This new layer is due to the migration and proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) in the tunica media to the intima, followed by ECM synthesis and remodeling. Here, we show that QSOX1 knockdown obtained by siRNA inhibited VSMC migration and proliferation as determined by scratch, transwell and crystal violet assays, respectively. In contrast, QSOX1 overexpression obtained with the vector pCR3.1QSOX1, stimulated these processes. In addition, extracellular sulfhydryl oxidase activity was found to mediate the migration but not de proliferation, as measured following the incubation of VSMC with recombinant QSOX1 both active and inactivated by substitution of cysteine 452 to serine. The role of QSOX1 *in vivo* was also examined. The expression of QSOX1 in the neointimal layer of balloon-injured rat carotids was high and peaked at 14 days post-injury. *In vivo* QSOX1 knockdown led to a significant decrease in PCNA expression at day 14 post-injury and a decreased intima/media area ratio at day 21 post-injury, compared with sham controls. In summary, our findings demonstrate that extracellular QSOX1 induces vascular smooth muscle cell (VSMC) migration and proliferation. Interestingly proliferation is not dependent on sulfhydryl oxidase activity of the enzyme *in vivo* and contributes to neointima thickening in balloon-injured rat carotids.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Proteína QSOX

Entre os diversos mecanismos pelos quais as proteínas podem ter suas funções reguladas, os mecanismos redox são exclusivos de proteínas que possuem resíduos de aminoácidos ou cofatores susceptíveis a oxidação e/ou redução. Entre os aminoácidos mais facilmente oxidáveis, destacam-se a metionina, triptofano, fenilalanina, tirosina e cisteína (CHIARUGI; FIASCHI, 2007). A presença de resíduos de cisteínas em particular, tem especial importância, uma vez que tiol proteínas têm sido cada vez mais consideradas proteínas chaves na sinalização redox (FOMENKO; GLADYSHEV, 2012).

As reações redox em resíduos de cisteína permitem que tiol proteínas possam ser reguladas de diversas formas. Por exemplo, a S-nitrosação, ou ligação de um grupo NO ao tiolato de resíduos de cisteína já foi considerada um mecanismo de controle de regulação da função protéica, semelhante ao mecanismo de fosforilação/defosforilação, uma vez que ambas as modificações são reversíveis e as reações nos dois sentidos podem ser catalisadas enzimaticamente (BENHAR et al., 2009).

De fato, várias tiol proteínas já foram descritas por estarem com função alterada por S-nitrosação. Por exemplo, a S-nitrosação da proteína dissulfeto isomerase (PDI) é um evento que anula a capacidade protetora da PDI em condições neurotóxicas, visto que PDI está envolvida na maturação e transporte de proteínas mal dobradas (UEHARA et al., 2006). Muitas outras proteínas sofrem S-nitrosação como processo fisiológico normal da célula, participando de processos chaves como transdução de sinal, reparo do DNA e controle da pressão sanguínea (BROILLET, 1999). Adicionalmente, cisteínas podem ser também oxidadas a ácido sulfênico e outras formas mais oxidadas; estes sulfênicos podem ser reversivelmente reduzidos, propiciando um mecanismo interessante para regulação redox, do tipo “*switch on/off*”, assim como a S-nitrosação (MANNICK; SCHONHOFF, 2004). Contudo, resíduos de cisteínas podem ser oxidados a dissulfeto por ligações intra-moleculares

ou inter-moleculares, ou ainda a dissulfetos mistos, no qual o outro componente geralmente é o tripeptídeo glutationa (GSH) (SEVIER; KAISER; LIEBERT, 2006).

Quanto à função de dissulfetos, a literatura tem relatado um papel importante destas pontes na estrutura tridimensional das proteínas. De fato, a exata função de uma proteína é consequência de seu arranjo estrutural, o qual depende, além da estrutura primária e secundária da cadeia polipeptídica, de modificações pós-traducionais, entre os quais estaria a formação de pontes dissulfeto (WEDEMEYER et al., 2000).

Atualmente, conhecem-se algumas tiol oxidases que participam do dobramento oxidativo no retículo endoplasmático, como *endoplasmic reticulum oxidoreductin 1* (Ero1), *essencial for respiration and viability 2* (Erv2), e protein disulfide isomerase (PDI) (DEPUYDT; MESSENS; COLLET, 2011; SEVIER, 2012). Estas proteínas oxidam tiois protéicos a dissulfetos à custa da redução do oxigênio molecular.

Além destas, uma proteína foi descrita e relacionada à quiescência celular e ao processo de dobramento oxidativo, sendo denominada quiescina sulfidril oxidase (QSOX) (HOOBER; THORPE, 1999).

Sulfidril oxidases podem ser classificadas em duas classes, dependente do co-fator utilizado: a) Sulfidril oxidases metalo-dependentes (contêm cobre ou ferro); e b) Sulfidril oxidases dependentes de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (THORPE et al., 2002). Sulfidril oxidases dependentes de FAD utilizam um anel de flavina adenina dinucleotídeo como co-fator redox para sua atividade catalítica, porque este pode ser facilmente reduzido por ditióis e oxidado pelo oxigênio molecular.

As QSOX (quiescina/sulfidril oxidase) são tiol oxidases dependentes de FAD flavina adenina dinucleotídeo que catalisam, através de uma série de reações de troca tiol-dissulfeto, a oxidação de di(tióis) a dissulfeto com a redução concomitante de oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (Reação 1) (THORPE et al., 2002).



Reação 1: Oxidação de grupos sulfidril a dissulfetos com a redução do oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

FONTE: KODALI & THORPE (2010).

Estruturalmente, a proteína QSOX é composta por um domínio TRX (tiorredoxina) na porção N-terminal, seguido de um domínio espaçador característico de QSOX, helix-rich region (HRR), e um domínio Erv/Alr (“Essential for respiration and vegetative growth”/“*augmenter of liver regeneration*”) na porção C-terminal, sendo este último domínio o qual contém o sítio de ligação a FAD (Figura 1) (KODALI; THORPE, 2010). Erv1 e Erv2 são proteínas de levedura homólogas à proteína Alr de mamíferos (HECKLER et al., 2008b). Estas proteínas (Erv e Alr) são pequenas tiol oxidases com diversas funções (COPPOCK; THORPE, 2006; THORPE; COPPOCK, 2007). Alr, também chamada de hepatopoietina é um fator de crescimento que estimula a proliferação de hepatócitos para a regeneração do tecido hepático (CHEN et al., 2003).

Recentemente, Alon e colaboradores (2012), elucidaram a estrutura tridimensional da QSOX1 de *Homo sapiens* e *Trypanosoma brucei*, e demonstraram que a proximidade espacial dos domínios Trx e Erv são cruciais para a atividade catalítica da enzima, pois permitem a transferência dos elétrons provenientes do substrato entre os motivos catalíticos (ALON et al., 2012).

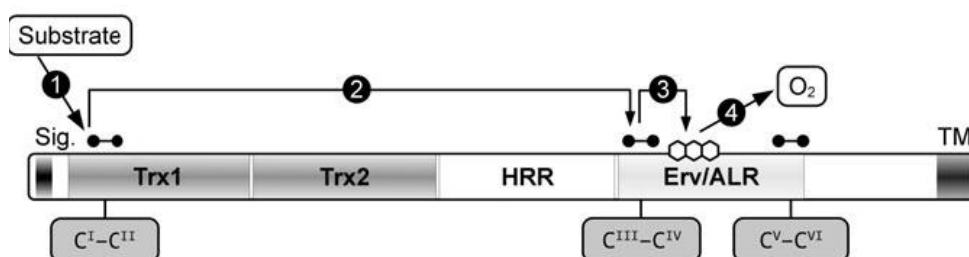


Figura 1: Esquema demonstrativo dos domínios estruturais da QSOX (de metazoários), mostrando as etapas enzimáticas envolvidas no processo de oxidação. A atividade catalítica da QSOX é dada através da catálise (oxidação) de dissulfetos em substratos reduzidos (1) através da redução do seu domínio CxxC_{Trx} proximal, o qual repassa subsequentemente os equivalentes eletrônicos ao domínio Erv/Alr (2) (CIII e CIV), e posteriormente a FAD (3), o qual por fim realiza a transferência dos elétrons para os substratos receptores, como o oxigênio molecular (4).

FONTE: Figura adaptada de KODALI & THORPE (2010).

A proteína QSOX possui três motivos CxxC envolvidos nos processos catalíticos: motivo CxxCTrx: contendo as Cys70 e 73; motivo CxxCProx: com as Cys449 e 452; e motivo CxxCDistal: com as Cys 509 e 512, os quais são típicos das proteínas pertencentes à superfamília das Tiorredoxinas e participam de reações tiol-dissulfeto (COPPOCK; CINA-POPPE; GILLERAN, 1998). O domínio Trx2 não possui motivo CxxC, e está localizado antes do terceiro domínio “espaçador” (Figura 1) (HECKLER et al., 2008a; THORPE et al., 2002). Em mamíferos são descritas duas formas para enzimas QSOX: QSOX1 (gene *QSCN6*) com isoforma longa (com domínio transmembrana) e curta (solúvel) produzida pela perda do domínio transmembrana (Figura 2); e QSOX2 (gene *QSOXM*) descrita em neuroblastoma (Figura 3) (COPPOCK; THORPE, 2006; RADOM et al., 2006).

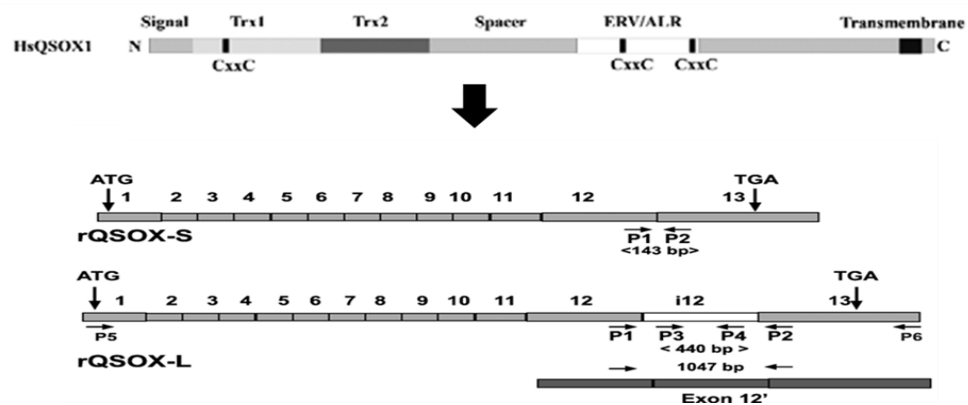


Figura 2: Esquema demonstrativo de QSOX1 com suas duas isoformas. Isoforma curta que não apresenta o domínio transmembrana e a isoforma longa que possui esse domínio.

FONTE: COPPOCK & THORPE (2006) e RADOM, et al., (2006).



Figura 3: Esquema demonstrativo de QSOX2. Isoforma descrita no sistema nervoso e conhecida também como QSOXN.

FONTE: COPPOCK & THORPE (2006).

Radom e colaboradores (2006) descreveram para ratos a existência de duas sequências de cDNA para QSOX1 em córtex cerebral de rato, sendo um transcrito

longo e um transcrito curto que diferem por 851 nucleotídeos devido ao processamento alternativo do RNA mensageiro (RNAm) (Figura 2). Sabe-se então, que o gene da QSOX1 pode ou não sofrer processamento alternativo do seu RNAm gerando duas isoformas: Isoforma longa, com 12 éxons (QSOX1a), a qual possui um domínio transmembrana na região C-terminal; e uma isoforma curta, com 11 éxons (QSOX1b) que perde este domínio transmembrana após o processamento alternativo do RNAm (COPPOCK; THORPE, 2006). A princípio, não há evidências de que os dois produtos da QSOX1 possuam diferença em sua especificidade catalítica intrínseca, pois ambas detêm o mesmo conjunto de domínios catalíticos (HECKLER et al., 2008a); entretanto, o nível de expressão protéica é significativamente diferente entre as duas isoformas (KODALI; THORPE, 2010), sendo a proteína QSOX1b a mais expressa na maioria dos tecidos (COPPOCK et al., 1993; HOOBER et al., 1996; OSTROWSKI; KISTLER, 1980).

Wittke e colaboradores (2003) descreveram a segunda forma do gene da QSOX (QSOXN ou QSOX2) em linhagem celular de neuroblastoma humano, a qual compreende 12 éxons, possui alta homologia com os membros da família QSOX1, e é predominantemente localizada próxima as membranas plasmática e nuclear. Este mesmo grupo de pesquisa demonstrou também que a inativação do gene QSOX2 confere resistência a apoptose induzida por interferon (IFN), e que a indução da expressão de QSOX2 sensibiliza as células a apoptose (WITTKE et al., 2003).

A expressão de QSOX1 já foi demonstrada em diversos ambientes, como trato reprodutor masculino (OSTROWSKI; KISTLER; KISTLER, 1979, BENAYOUN ET AL., 2001), na clara do ovo de galinha (HOOBER et al., 1996; HOOBER, 1999), fibroblastos de pulmão (COPPOCK et al., 1993), tecido uterino (MUSARD et al., 2001), ilhotas de Langerhans, glândula parótida, glândulas apócrinas da pele, células no intestino que secretam peptídeos e proteínas (COPPOCK; THORPE, 2006), cérebro, epiderme (MATSUBA et al., 2002), glândula sebácea, placenta (THORPE; COPPOCK, 2007) e leite bovino (JAJE et al., 2007). Coppock e Thorpe 2006 demonstraram a intensidade da expressão das duas isoformas de QSOX em diversos ambientes (Figura 4).

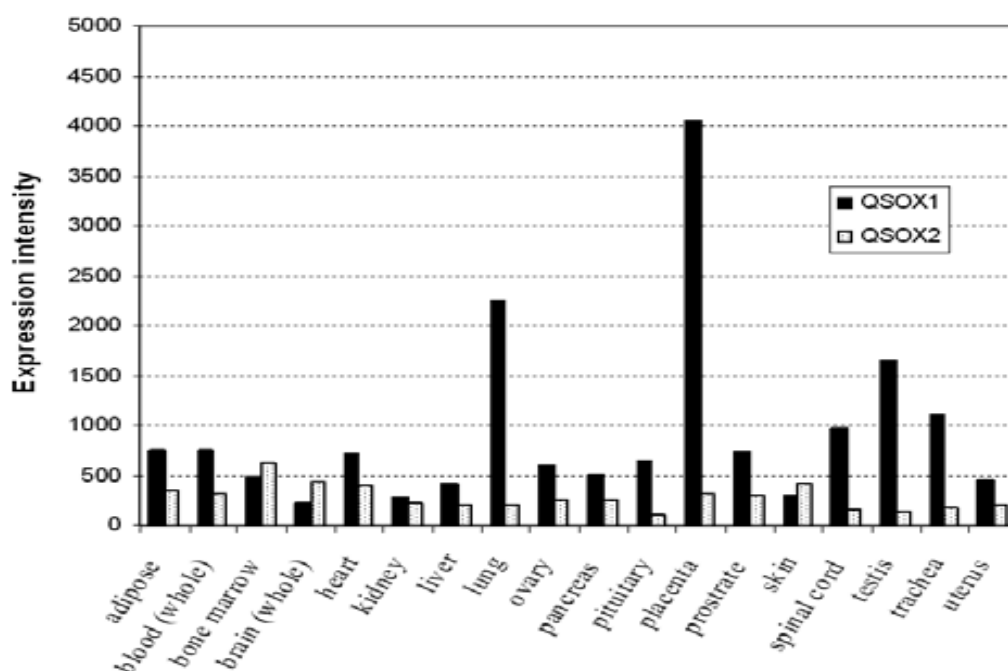


Figura 4: Intensidade de expressão das isoformas de QSOX: QSOX1 representa a isoforma com domínio transmembrana e QSOX2 representa a proteína de sistema nervoso.

FONTE: COPPOCK & THORPE (2006).

Nosso grupo demonstrou que a QSOX1 está presente em soro fetal bovino, (ZANATA et al., 2005), tecidos fetais, e derivados dos folhetos mesodérmico e ectodérmico (PORTES et al., 2008). Nesse trabalho, mostramos ainda que a expressão desta enzima em tecidos epiteliais aumenta durante o desenvolvimento fetal, indicando um papel regulatório na programação embriogênica. Recentemente, QSOX1 foi encontrada em soro bovino adulto (ISRAEL et al., 2014).

A literatura propõe um papel catalisador para QSOX1 na modelação e remodelação dos componentes protéicos, principalmente na matriz extracelular, que apresentam tióis susceptíveis à oxidação, o que pode levar à formação de dissulfetos ou não (COPPOCK; THORPE, 2006; CHAKRAVARTHI et al., 2007). A localização extracelular evidencia que a enzima atua sobre substratos na matriz e, portanto, atua como um regulador do estado redox de determinadas proteínas da matriz propriamente dita e também as proteínas da superfície celular (HECKLER et al., 2008b).

Recentemente, Ilani e colaboradores (2013) propuseram que a presença da atividade oxidase de QSOX1 é crucial para a deposição eficaz de componentes da

matriz extracelular, especialmente a laminina, e consecutivamente na remodelação da matriz extracelular na promoção de acontecimentos de invasão tumoral. Neste contexto também foi descrita para QSOX1 uma função proliferativa como demonstrado em culturas de fibroblastos com baixa expressão de QSOX1 que só retornou o estado proliferativo quando o meio de cultura foi suplementado com enzima recombinante (ILANI et al., 2013).

1.2 QSOX1 em situações patológicas

Apesar de existirem muitos dados sobre a expressão e a atividade catalítica da QSOX, seus papéis fisiopatológicos ainda não foram bem estabelecidos. A enzima já se mostrou participante de eventos fisiológicos e fisiopatológicos, e muitas vezes com funções ambíguas.

Estudos recentes têm descrito a QSOX1 como uma enzima associada à ambientes celulares e extracelulares, participando de diferentes funções, como pró ou anti-apoptótica e marcadora de bom ou mau prognóstico em câncer. As diferentes funções dependem do tecido analisado (LIMOR-WAISBERG; BEN-DOR; FASS, 2013; SEVIER, 2012; KODALI; THORPE, 2010).

É conhecida a associação entre a expressão de QSOX1 e inibição da proliferação de diversas linhagens celulares (MUSARD et al., 2001; HELLEBREKERS et al., 2007), assim como possível biomarcador de malignidade em adenocarcinoma pancreático, provavelmente pela ativação da capacidade metastática (Antwi et al., 2009). Em eventos de morte celular, enquanto a QSOX2 foi descrita como pró-apoptótica (WITTKKE et al., 2003), a QSOX1 já foi descrita como reguladora de eventos de inibição de morte celular (MOREL et al., 2007), biomarcadora de bom prognóstico em câncer de mama humano (possivelmente através da inibição de tumorigênese (PERNODET et al., 2012), ativação de morte celular em células endoteliais e macrófagos na aterosclerose (DE ANDRADE et al., 2011), e proliferativa através da ativação de metaloproteases de matriz extracelular (MMP) -2 e -9 (KATCHMAN et al., 2011).

Uma possível associação entre a QSOX1 e câncer de pâncreas foi encontrada (ANTWI et al., 2009; KATCHMAN et al., 2011). Neste trabalho, o plasma de pacientes com câncer de pâncreas apresentou peptídeos da QSOX1, e os níveis de

QSOX1 no tecido tumoral estavam altos, mas ausentes no estroma adjacente. Recentemente foi descrito que QSOX1 promove a invasão das células tumorais de pâncreas mediadas por metaloproteínas como a MMP9 e a MMP2 (KATCHMAN et al., 2011).

Recentemente, surgiu também um papel para a QSOX1 no sistema cardiovascular. Verificou-se a presença da QSOX 1 no sobrenadante de células de músculo liso da aorta (SMC) e progenitoras de músculo liso através de ensaios de proteômica (SIMPER et al., 2010). De Andrade e colaboradores (2011) mostraram que a QSOX regula a ativação de morte celular, através da indução de processos apoptóticos e de diferenciação em células endoteliais e macrófagos na aterosclerose (DE ANDRADE et al., 2011). E foi também descrita como um possível marcador de insuficiência cardíaca (MEBAZAA et al., 2012).

1.3 Aterosclerose e reestenose

A aterosclerose é uma doença crônica inflamatória causada pela formação de ateromas nos vasos sanguíneos. Os ateromas são placas formadas principalmente por lipídios e células inflamatórias que se acumulam na parede do vaso causando o estreitamento do lúmen, podendo levar à interrupção total do fluxo sanguíneo (SCHWARTZ et al., 1991). Dependendo da localização, pode causar infarto do miocárdio e derrames e, em muitos casos, é fatal (GLAUDEMANS et al., 2010; NOFER; BRODDE; KEHREL, 2010).

A artéria normal possui divisões histológicas bem definidas (Figura 5), sendo uma primeira camada composta por células endoteliais (túnica íntima), seguida de uma túnica média, formada principalmente células musculares lisas e fibras elásticas dando firmeza aos vasos, e por fim a túnica adventícia rica em matriz extracelular que confere a sustentação (TULIS, 2007).

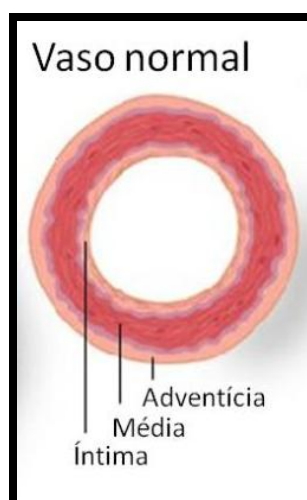


Figura 5: Esquema representativo das divisões histológicas da artéria normal. Túnicas representadas: adventícia, média e íntima.

FONTE: Imagem adaptada da American Heart Association Learn and Live® (2014).

Quando os níveis de colesterol na corrente sanguínea são elevados há o risco de acúmulo de LDL (Low Density Lipoprotein), cálcio e outras substâncias sob o endotélio do vaso, levando a formação de placas (Figura 6) (NOFER; BRODDE; KEHREL, 2010). O LDL-colesterol circulante atravessa o endotélio e se acumula entre a média e a íntima. Quando ocorre um aumento dos níveis de LDL, essas partículas são depositadas nas artérias com conseqüente oxidação. As partículas oxidadas são citotóxicas para as células endoteliais resultando em lesões e ativação das células endoteliais, levando a um processo inflamatório crônico (BERLINER et al., 1995). Monócitos e linfócitos migram através do endotélio e permanecem na íntima. Lá, macrófagos fagocitam as partículas de LDL-colesterol modificadas pela oxidação, formando as células espumosas ou “foam cells” (LIBBY, 2001). As células espumosas podem se romper e formar estrias gordurosas. Células musculares lisas migram da média em direção a íntima, e contribuem para a deposição de matriz extracelular. Assim, células vivas, restos celulares e matriz extracelular compõem placa aterosclerótica, a qual leva a estenose (HANSSON, 2005) (Figura 6).

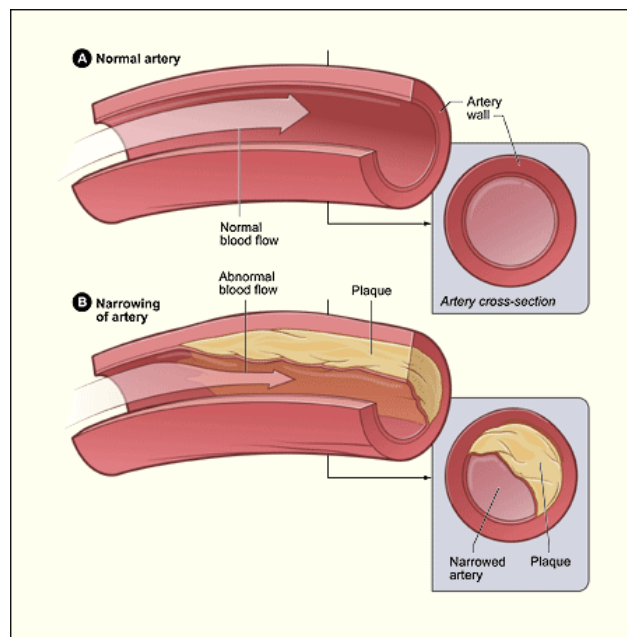


Figura 6: Representação do processo de aterosclerose. Colesterol LDL atravessa a camada média do vaso. O acúmulo do colesterol juntamente com outras moléculas forma o ateroma, estreitando o lúmen do vaso.

FONTE: Imagem adaptada de National Heart, Lung and Blood Institute (2014).

A desobstrução do vaso pode ser realizada com a técnica da angioplastia por cateter balão. O catéter balão é introduzido no lúmen do vaso aterosclerótico e posteriormente é insuflado, comprimindo o ateroma e restabelecendo o fluxo sanguíneo (GRÜNTZIG; SCHNEIDER, 1977). Contudo, alguns pacientes após esse procedimento voltam a ter complicações no mesmo vaso em que a placa foi “removida”. Estudos levaram a descoberta de um novo processo patológico conhecido como reestenose (CARAMORI; YAMAMOTO; ZAGO, 1997).

A reestenose é o resultado de diversos processos que ocorrem devido a danos mecânicos provocados pelo cateter balão, que remove completamente o revestimento endotelial da íntima. Remodelamento arterial e hiperplasia neoíntimal são eventos intimamente associados ao desenvolvimento da reestenose (NAKATANI et al., 2003; ZARGHAM, 2008). O mecanismo de reestenose apresenta uma fase inicial que corresponde a formação de neoíntima e um atraso de fase de remodelação constritiva (ZARGHAM, 2008)

Existem modelos animais com diferentes graus de similaridade de angioplastia transluminal percutânea a fim de se investigar os fenômenos biológicos básicos

(JACKSON, 1994). A lesão por cateter balão em carótidas de ratos é um modelo bem estabelecido para o estudo de proliferação (CLOWES; REIDY; CLOWES, 1983), migração (CLOWES; SCHWARTZ, 1985) em células musculares lisas (VSMC), induzindo a reestenose.

O procedimento da formação da neoíntima em rato é bem descrito e ainda muito estudado (Figura 7). A cirurgia é realizada na carótida esquerda com auxílio de um cateter balão. Após 14 dias a formação da neoíntima está completa, e após 21 dias estabilizada (CLOWES; CLOWES, 1986; CLOWES; REIDY; CLOWES, 1983; TULIS, 2008). Logo após a lesão há a perda das células endoteliais, rompimento das fibras elásticas e exposição das células musculares lisas (CLOWES; CLOWES, 1986). A disfunção das células endoteliais leva a expressão aumentada do inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1), fibronectina, trombospondina, integrinas, selectinas, angiotensina e dezenas de fatores de crescimento; entre os principais presentes estão: TGF- β , PDGF, IL-1, IGF-1. Outros fatores também são liberados nas células musculares lisas ativando-as (NIKOL; HUEHNS; HÖFLING, 1996) juntamente com a ativação de alguns oncogenes (MULLER, 1997), e PCNA (Proliferating-Cell Nuclear Antigen), que é uma proteína nuclear necessária para a síntese de DNA pela DNA polimerase (MORISHITA et al., 1993). Em ratos após 48 horas as SMCs começam a migrar da camada média e após 96 horas migram para formar a neoíntima (CLOWES; CLOWES, 1986), juntamente com um aumento significativo na síntese protéica. Há a deposição de colágeno, elastina e proteoglicanos (STRAUSS et al., 1994). Durante os primeiros 14 dias ocorre o maior espessamento da neoíntima (CLOWES; CLOWES, 1986), composta por células musculares lisas não diferenciadas, sem capacidade contrátil (SCHWARTZ; CAMPBELL; CAMPBELL, 1986), juntamente com a expressão de proteínas da matriz extracelular como fibronectina, osteopontina e vitronectina. Tanto o RNA mensageiro (RNAm) como a proteína fibronectina apresentam expressão acumulada na porção luminal da neoíntima (BAUTERS; ISNER, 1997). Após o 21º dia de lesão, a neoíntima começa a se estabilizar tendo uma diminuição no espessamento em relação ao 14º dia (CLOWES; CLOWES, 1986).

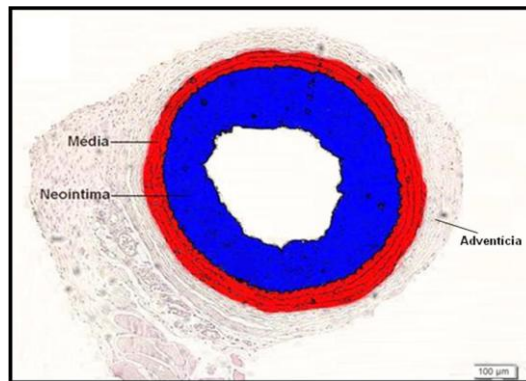


Figura 7: Artéria carótida de rato 14 dias após lesão arterial, com neoíntima proeminente. Área delimitando a região íntima e média de carótida de rato após 14 dias da lesão.

FONTE: Imagem produzida por Cofré, A.H, 2010. Dissertação de mestrado.

Dentre os fatores envolvidos na resposta vascular à lesão mecânica, a participação de processos redox associados à sinalização e lesão celular nas diversas fases do processo de reparação têm um papel importante (SOUZA et al., 2000). Estes processos redox são basicamente relacionados a formação enzimática de espécies reativas de oxigênio (ROS) (HENSLEY et al., 2000). Muitas enzimas geradoras de ROS estão envolvidas na sinalização redox. As várias fontes potenciais de ROS, isoformas vasculares do complexo NADPH oxidase parece ser uma das principais vias de geração dessas espécies.

As NADPH oxidases da família Nox são a principal fonte de ROS com finalidade de sinalização compartimentalizada em várias células (TERADA, 2006), particularmente células vasculares (LEE et al., 2009). A expressão diferencial de isoformas catalíticas da NADPH oxidase podem influenciar as alterações fenotípicas que ocorrem nas células musculares lisas (VSMCs) durante a progressão da reparação vascular (LASSÈGUE; SAN MARTÍN; GRIENDLING, 2012). A expressão de Nox1, isoforma que aumenta inicialmente e perdura durante fases intermediárias da reparação (até aproximadamente 7 dias) (SZOCS, 2002), está associada com a indução do fenótipo migratório, proliferativo e secretor, característico de células neointimais (LEE et al., 2009). Ao contrário, a indução de Nox4, isoforma que está aumentada em fases mais tardias da reparação (acima de 10 dias), está associada à indução do fenótipo diferenciado e quiescente de células musculares lisas vasculares (CLEMPUS et al., 2007).

Foi mostrado que a Nox vascular é fortemente regulada por reagentes específicos de grupos tiol via mecanismos não diretamente relacionados ao estado redox da glutathiona intracelular (JANISZEWSKI et al., 2000). Dessa maneira esse mesmo grupo mostrou uma associação física e funcional entre a NADPH oxidase e a PDI, que é uma proteína da super família da Tiorredoxina, com multi domínios e multi funções, mas com comportamento redox versátil (JANISZEWSKI et al., 2005).

PDI é uma proteína abundante na célula com comportamento *redox* variável e conhecida interação com outras proteínas. Está localizada principalmente no retículo endoplasmático, onde promove o dobramento oxidativo de outras proteínas através de reações de oxidação, redução e isomerização (JANISZEWSKI et al., 2005).

É interessante ressaltar que a PDI é um substrato da QSOX (KODALI; THORPE, 2010) e que a QSOX tem sua expressão aumentada durante a resposta vascular à lesão e sustenta a formação da neoíntima, dessa maneira esses processos redox mediados pela PDI e NADPH oxidase devem participar da remodelação dessa nova camada após lesão por catéter balão.

1.4 Proliferação celular

Um grande número de estímulos ambientais, incluindo fatores de crescimento, mediadores inflamatórios, componente de matriz, e as interações célula- célula foram mostrados para regular a proliferação e diferenciação das VSMC (OWENS; KUMAR; WAMHOFF, 2004).

A proliferação de VSMC ainda é um processo controverso. Tem sido relatado que o TGF- β exerce um efeito inibidor do crescimento de VSMC através da indução de parada de ciclo celular na fase G1 (REDDY; HOWE, 1993). No entanto, Stouffer e Owens demonstraram que TGF- β promove a proliferação de VSMC cultivadas (STOUFFER; OWENS, 1994), o que é consistente com os resultados recentes que TGF- β aumenta a proliferação VSMC através das vias Smad3 e ERK MAPK (SUWANABOL et al., 2012; TSAI et al., 2009). Além de TGF- β , outros fatores de crescimento incluindo o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos - 2 (FGF - 2) e fator de crescimento epidérmico (EGF) também tem sido mostrado que estimulam a proliferação de VSMC (HAYASHI et al., 1999).

Recentemente Shi e colaboradores (2014) relataram que o TGF- β através da Smad3 é um ativador potente da via de sinalização ERK MAPK, tanto *in vitro* como *in vivo*. Esse grupo descobriu que a ativação de ERK MAPK por TGF- β é um processo que é muito reforçado pela superexpressão de Smad3 e inibida por RNA interferência (siRNA) para Smad3. Além disso, nesse trabalho o bloqueio da ERK MAPK diminui a proliferação de VSMC induzida por TGF- β . Finalmente, demonstraram que a superexpressão de Smad3 *in vivo* aumenta a ativação de ERK MAPK, a qual está associada com a proliferação de VSMC. Estes dados sugerem um novo mecanismo pelo qual o TGF- β , através da Smad3 e ERK MAPK, regula a positivamente a proliferação das VSMC e a formação de hiperplasia intimal (SHI; CHEN, 2014).

Proliferação celular é um processo extremamente regulado onde a progressão pelas fases do ciclo celular é controlada, de modo muito preciso, por uma rede bioquímica complexa, que sinaliza o andamento e as passagens entre G1, S, G2 e M (Figura 8). Esse controle é vital para a manutenção do ritmo de proliferação, para garantir a correta replicação do material genético, segregação dos cromossomos, e coordenar os processos de diferenciação, senescência e morte (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

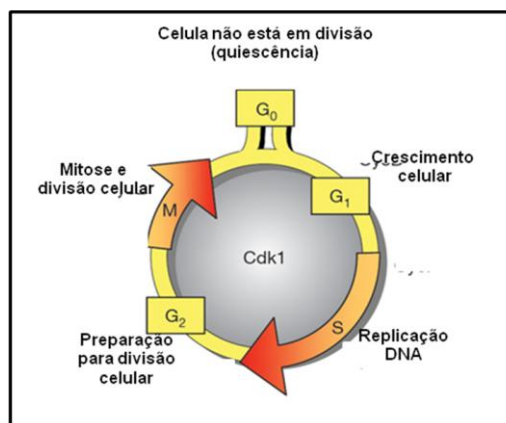


Figura 8: Esquema do ciclo celular. Representação das fases do ciclo celular.

FONTE: SANTAMARÍA, et al. (2007)

Inicialmente, essas vias respondem a fatores extracelulares que, através de uma cascata de sinalização, fornecem o estímulo para que a célula saia de G1 e se prepare para entrar em S. Desse modo, a célula permanece durante G1 em um estado quiescente, frequentemente referido como G0, até que ocorra o estímulo

mitótico extracelular que sinalize a saída de G1(EKHOLM; ZICKERT; REED, 2001). Ao fim de G1 após o momento definido como ponto de restrição, o sistema que regula a progressão do ciclo torna-se independente da sinalização extracelular, passando a ser controlado por mecanismos intracelulares que envolvem a sequencial ativação de uma família de proteínas chamadas quinases dependentes de ciclinas- CDKs (PARDEE, 1974) (Figura 9). A atividade dessas enzimas é dependente da associação com uma subunidade reguladora positiva pertencente à família das ciclinas, formando um complexo catalítico ciclina-CDK ativo. Os complexos ativos por sua vez atuam sobre macromoléculas centrais do sistema de controle do ciclo celular (SHERR; ROBERTS, 1999).

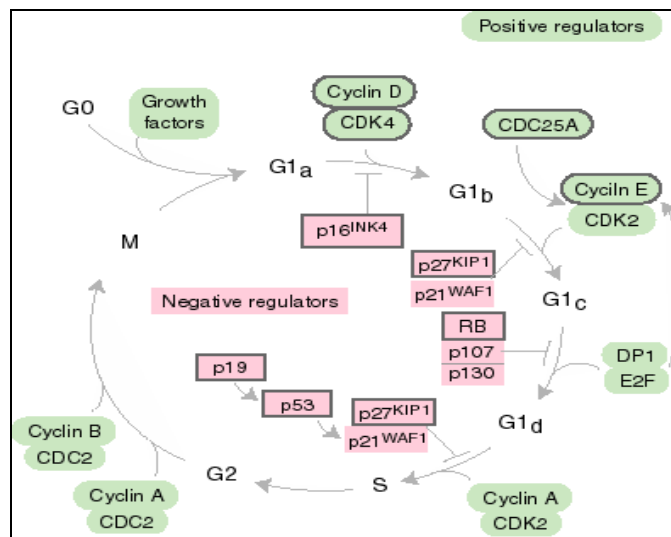


Figura 9: Esquema com as fases do ciclo celular e regulação pelas ciclinas-CDKs.

Fonte: CHIU & DAWES (2012).

No contexto da proliferação celular, o gene da QSOX1 foi inicialmente identificado em bibliotecas de fibroblastos em quiescência celular (COPPOCK et al., 2000, 1993). Nestes trabalhos, foi demonstrado que QSOX1 era positivamente regulada em células com parada de crescimento induzido por contato celular, ou seja, na fase G0, mas não por inibidores farmacológicos do ciclo, como lovastatina (que induz parada em G1) ou afidicolina (que bloqueia a síntese de DNA). A parada de crescimento, induzida por baixas concentrações de soro, mas sem contato célula-célula também estimula a expressão da QSOX1. Além disso, o estado adesivo da

célula altera a expressão da QSOX1. Células desaderidas dos frascos sejam por digestão com tripsina como por *scrapers* induzem a expressão do gene, e as células com maior expressão levam mais tempo para re-aderirem (COPPOCK et al., 2000, 1993).

Considerando que (i) a QSOX1 é uma proteína cujas funções fisiopatológicas ainda são desconhecidas, (ii) a QSOX1 parece regular o ciclo celular, e (iii) que a regulação da atividade (JANISZEWSKI et al., 2005) e da expressão (FERNANDES et al., 2009) da NADPH oxidase vascular depende de tiol-oxiredutase PDI, postulamos que a QSOX1, uma tiol oxidase, participe do processo de formação da neointima pós lesão por cateter balão.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho foi investigar a participação da proteína QSOX em eventos proliferativos e migratórios e dessa maneira analisar o possível papel dessa proteína na formação da neointima durante o processo de reestenose em carótidas de ratos lesadas com cateter balão.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da superexpressão de QSOX1 na migração, proliferação de células musculares lisas in vitro.
- Determinar o efeito do silenciamento da QSOX1 por meio de RNAi na migração, proliferação de células musculares lisas in vitro;
- Verificar o curso da lesão com catéter balão em carótida de rato;
- Investigar e quantificar a presença da QSOX1 na neoíntima de rato;
- Realizar o “knockdown” de QSOX1 por RNAi em carótida de rato lesada com catéter balão;
- Avaliar o efeito do knockdown de QSOX1 na relação íntima/média.

3. ARTIGO SUBMETIDO

The extracellular flavo-oxidase QSOX1 supports vascular smooth muscle cell migration and proliferation: evidence for a role in neointima growth

Beatriz E. Borges^{a,1}, Márcia H. Appel^{a,1,2}, Axel R. Cofré^{a,1}, Chelin A. Steclan^a, Silvio M. Zanata^a, Frédéric Esnard^b, Francisco R. M. Laurindo^c and Lia S. Nakao^{a,}*

^aDepartamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Curitiba 81531-980, Brazil

^bINSERM UMR 1100, Université François Rabelais F-37032 Tours, France

^cLaboratório de Biologia Vascular, Heart Institute, Universidade de São Paulo, São Paulo 05403-900, Brazil.

***Corresponding author:** Lia Sumie Nakao, Departamento de Patologia Básica, room 153, Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil, 81531-980, Tel: + 55 41 3361-1760, Fax: +55 41 3266-2042, Email: lia.nakao@ufpr.br

Footnotes: ¹[BEB, MHA and ARC contributed equally to this work.](#) ²Present address: Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil.

Abbreviations:

ALR, augmenter of liver regeneration; bFGF, basic fibroblast growth factor; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; ECM, extracellular matrix; HRP, horseradish peroxidase; IgG, immunoglobulin G; MTT, 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PDGF, platelet-derived growth factor; QSOX1, quiescin sulfhydryl oxidase 1 (EC 1.8.3.2); siRNA, small interfering RNA; VSMC, vascular smooth muscle cell.

ABSTRACT

Quiescin sulfhydryl oxidase 1 (QSOX1, EC 1.8.3.2) is a flavoenzyme largely present in the extracellular milieu whose physiological functions and substrates are not known. QSOX1 has been implicated in the regulation of tumor cell survival, proliferation and migration, in addition to extracellular matrix (ECM) remodeling. However, data regarding other pathophysiological conditions are still lacking. Arterial injury by balloon catheter is an established model of post-angioplasty restenosis. This technique induces neointima formation due to migration and proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC), followed by ECM synthesis and remodeling. Here, we show that QSOX1 knockdown inhibited VSMC migration and proliferation. In contrast, QSOX1 overexpression stimulated these processes. In addition, extracellular sulfhydryl oxidase activity was found to mediate the pro-migratory but not the pro-proliferative role of QSOX1, as measured following the incubation of VSMC with active or inactive recombinant QSOX1. To recapitulate *in vivo* VSMC pathophysiology, balloon-induced arterial injury was performed, promoting neointima formation due to VSMC migration/proliferation, followed by ECM synthesis and remodeling. The expression of QSOX1 in the neointimal layer of balloon-injured rat carotids was high and peaked at 14 days post-injury. *In vivo* QSOX1 knockdown led to a significant decrease in PCNA expression at day 14 post-injury and a decreased intima/media area ratio at day 21 post-injury, compared with scrambled siRNA transfection. In summary, our findings demonstrate that extracellular QSOX1 induces vascular smooth muscle cell (VSMC) migration and proliferation *in vitro* and contributes to neointima thickening in balloon-injured rat carotids.

Highlights:

Extracellular QSOX1 induces migration and proliferation of VSMC.

Migration of VSMC depends on the sulfhydryl oxidase activity of the exogenous QSOX1.

In vivo QSOX1 knockdown inhibits neointima growth in rat carotid.

Keywords: quiescin sulfhydryl oxidase; hydrogen peroxide; cell proliferation; cell migration; vascular smooth muscle cells, flavoproteins, neointima, vascular repair.

INTRODUCTION

Quiescin sulfhydryl oxidase 1 (QSOX1) is a flavin-linked sulfhydryl oxidase that localizes to the ER/Golgi apparatus (MAIRET-COELLO et al., 2004; THORPE et al., 2002) or the extracellular milieu (AMIOT et al., 2004; BENAYOUN et al., 2001; COPPOCK et al., 2000; HOOBER et al., 1996; JAJE et al., 2007b; SIMPER et al., 2010; THORPE et al., 2002; ZANATA et al., 2005). QSOX1 exists in two isoforms that are produced by alternative splicing (RADOM et al., 2006). The short QSOX1, the most abundantly expressed isoform (COPPOCK; THORPE, 2006), is secreted (BENAYOUN et al., 2001; MATSUBA et al., 2002; ZANATA et al., 2005), while the long isoform is a transmembrane protein (CHAKRAVARTHI et al., 2007) that was recently demonstrated to be proteolytically cleaved to a soluble and secreted variant (RUDOLF; PRINGLE; BULLEID, 2013). Due to the extracellular localization of QSOX1, roles related to extracellular matrix (ECM) remodeling or extracellular protein assembly have been attributed to this protein (COPPOCK; THORPE, 2006). Indeed, the requirement for QSOX1 activity to incorporate laminin trimer into the ECM, providing a functional surface, was shown (ILANI et al., 2013). In addition, extracellular QSOX1 has been associated with tumor progression (ANTWI et al., 2009; KATCHMAN et al., 2013; OUYANG et al., 2005; SOLOVIEV et al., 2013; SONG et al., 2010) due to the activation of cellular proliferation and matrix metalloproteinases (MMP) (KATCHMAN et al., 2011, 2013). In contrast, previous studies have demonstrated that QSOX1 negatively regulates cell cycle progression (COPPOCK et al., 2000, 1993; HELLEBREKERS et al., 2007; MUSARD et al., 2001). However, despite such findings, data regarding the physiological substrates and roles of QSOX1 remain scarce.

Recently, a role for QSOX1 in the cardiovascular system has emerged. It has been found in the supernatant of aortic smooth muscle cells (SMC) and smooth muscle progenitor cells with proteomic approaches (SIMPER et al., 2010) and in the necrotic areas of atherosclerotic plaques (DE ANDRADE et al., 2011), and it has been described as a possible marker of heart failure (MEBAZAA et al., 2012). Additionally, protein disulfide isomerase (PDI), which cooperates with QSOX1 during protein folding and isomerization (RANCY; THORPE, 2010), regulates the activity of vascular NADPH oxidase (JANISZEWSKI et al., 2005), which is a key element of

vascular repair after balloon injury (LEE et al., 2009; SZOCS, 2002). Arterial injury by balloon catheter induces neointima formation followed by constrictive remodeling, as primarily determined in experimental models of restenosis (FERNS; AVADES, 2000; JACKSON, 1994). It is widely accepted that medial SMC respond to injury, immediately proliferating and migrating to the intima. There, neointimal cells continue proliferating, reaching a maximum rate between 4 and 7 days post-injury (CLOWES et al., 1989). The resulting neointima prominently appears at day 14, after which ECM remodeling takes place (BATCHELOR; ROBINSON; STRAUSS, 1998), while proliferation and migration cease (FERNS; AVADES, 2000; LEITE et al., 2004).

Because neointima thickening is mediated by cell migration, cell proliferation and ECM synthesis/remodeling, we postulated that QSOX1 might have a role in this process. Our findings demonstrate that extracellular QSOX1 induces vascular smooth muscle cell (VSMC) migration and proliferation *in vitro* and contributes to neointima thickening in balloon-injured rat carotids.

MATERIAL AND METHODS

VSMC culture- Aortas were obtained from male Wistar rats weighing 250 g. Arteries were dissected and rinsed with PBS containing antibiotics and fungicide. The media layer was then cut into 1-mm² fragments. These explants were plated with their luminal surfaces facing upward in a 35-mm culture dish and covered with 0.5 mL high glucose DMEM (Life Technologies) containing 20% fetal calf serum (Life Technologies) and 40 mg/L Garamycin® (Schering-Plough). After migration, VSMC were detached with trypsin and subcultured. VSMC identity was confirmed by immunofluorescence with anti-smooth muscle actin (Sigma-Aldrich). Cells in passages 3-7 were assayed (MCMURRAY; PARROTT; BOWYER, 1991). This protocol was approved by the Research Ethics Committee (CEUA) of the Biological Sciences Building, protocol number 412/2009.

QSOX1 knockdown and overexpression in VSMC -QSOX1-specific siRNA (targeting both QSOX1 transcripts) and scrambled siRNA duplexes (Stealth RNAi™, Invitrogen) were designed with Block-iTRNAi Designer. Sense sequences corresponding to the QSOX1 (which knockdown both QSOX1 isoforms) and scrambled duplexes were 5'-UGGAGCCUGCCAAGCUGAAGGAUUAU-3' and 5'-UGGCCGUCCAACGGUAAGGAGUAU-3', respectively. QSOX1 knockdown was achieved by transfecting VSMC with 50 nM QSOX1 siRNA or scrambled siRNA duplexes using Oligofectamine (Invitrogen). Cells (10-25 × 10³ cells/cm²) were transfected in OptiMEM (Life Technologies) for 4h, after which the transfection medium was replaced by complete medium. For QSOX1 overexpression, VSMC (10⁶) were resuspended in 0.4 mL OptiMEM and electroporated with 10 µg of QSOX1-pCR3.1 (BENAYOUN et al., 2001), corresponding to the short secreted isoform, or empty pCR3.1 (mock) plasmid in a GenePulserXCell electroporation device (BioRad). The electroporation settings were: 300 V, 500 µF and a resistance of infinity at exponential decay. Cells were kept at room temperature for 30 minutes and then plated to recover. Twenty-four hours later, they were seeded at a specific density for each assay (CHU; HAYAKAWA; BERG, 1987).

Recombinant QSOX1 production and activity- Recombinant wild type short isoform QSOX1 (herein referred to as mQSOX1) was produced as previously described (PORTES et al., 2008). The mutant inactive enzyme (HECKLER et al., 2008b) (herein referred to as mQSOX1C452S) was obtained by mutating the wild type construct using Megaprimer PCR method (KUSMA et al., 2008). A first PCR round was performed to produce a megaprimer with a site-directed mutation using the forward primer 5'-CTTCTTTGGCAGTCGTGACTGTGC-3' (nucleotide substitution underlined) and the reverse primer 5'-ATC GTC ATA GACTCTTCTTGAAAGCTTGGG-3' (*Hind*III site underlined). The second PCR round was performed with the purified megaprimer (306bp) as the reverse primer and 5'-GGGGTACCTACTCGTCCTCTGAC-3' as the forward primer (*Kpn*I site underlined). The mutant amplicon was double-digested with *Kpn*I and *Hind*III, and the purified insert was cloned into the pET32a vector (Novagen). Protein concentrations were determined using $\epsilon_{456\text{nm}} = 12.5 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (HECKLER et al., 2008a). Dithiothreitol oxidase activity was determined as previously described (RAJE; GLYNN; THORPE, 2002). While the wild type QSOX1 produced an average activity of 123 nmol H₂O₂/min/mg protein, the mutant protein was completely inactive, as measured before each assay.

Migration assays- The wound migration assay was performed as previously described (NALIWAICO et al., 2008). Briefly, 10⁵ cells were plated in 6-well plates. After the transfections, a P-200 pipette tip scraped the dish surface to generate a "wound". Cells were then cultivated in DMEM with 0.1% fetal calf serum. After 24, 48 and 72 h, cells were gently rinsed with PBS and photographed. Migration was calculated as migration distance. For this purpose, the difference in the distance between the edges of a scratch at the indicated times in relation to the distance measured at time 0 was calculated. In some assays, mQSOX1 or mQSOX1C452S recombinant proteins (50 nM) were added immediately after transfection with siRNA for the indicated times. Cell migration was also assessed using a transwell system with 8- μm pores (Corning). VSMC (5 x 10⁵) were seeded in the upper chamber. DMEM containing 20 ng/mL PDGF-BB (Sigma-Aldrich) or 10% fetal calf serum was added into the lower chamber at the indicated times to stimulate migration. After 6 h,

cells on the upper surface were removed by gentle wiping with a cotton swab, while migrating cells were counted in a hemocytometer (ZHU et al., 2011).

Proliferation assay - Cells (5×10^4) were plated in 96-well microplates (TPP). Twenty-four, 48 and 72 h after transfection, cells were collected and analyzed by crystal violet staining as described (BORGES et al., 2013). In some assays, mQSOX1 or mQSOX1C452S recombinant proteins (5 or 50 nM) were added immediately after transfections with siRNA or plasmids for the indicated times.

Cell viability – Cell viability was assessed with an MTT assay, as previously described (BORGES et al., 2013).

Quantitative PCR -Total RNA was extracted from 10^5 VSMC using the Invitrap Spin Cell RNA Mini Kit (Invitex) according to the manufacturer's protocol. Complementary DNA was synthesized from 50 ng total RNA, after treatment of RNA with DNase. Relative mRNA expression levels were determined using hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) as a housekeeping gene and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Reactions were performed in a Rotor-Gene 6000 thermocycler (Corbett) using a SYBR Green PCR Kit (Qiagen). The QSOX1 primers (which detected both QSOX1 isoforms) were: forward 5'-TGCATTCCATAAACGATTGG-3' and reverse 5'-GAAGTGAAGAGGACCCACA-3'. The HPRT primers were: forward 5'-CAGGCCAGACTTTGTTGGAT-3' and reverse 5'-TCCACTTTCGCTGATGACAC-3'. All primers were validated with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

SDS-PAGE and immunoblotting - Cells (5×10^5) were plated in 100-mm dishes (TPP). At 24, 48 and 72 h after transfection, cells were lysed (10 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1% deoxycholate and a protease inhibitor cocktail (Roche)) for 15 min at 4°C. After centrifugation ($10,000 \times g$, 10 min), supernatants were collected, and the protein contents were

determined with Bradford reagent (BioRad). Proteins were separated on a 10% SDS-PAGE gel and electroblotted onto a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with 5% skim milk. The antibodies used were rabbit polyclonal anti-PCNA (1:200, Dako), mouse monoclonal anti β -actin (1:1000, Sigma), anti-rabbit IgG coupled to HRP (1:1000, Sigma-Aldrich) and anti-mouse IgG coupled to HRP (1:5000, Sigma-Aldrich). Reactions were developed with a WestPico or Femto chemiluminescence kit (Pierce) and bands were detected on autoradiography films (Thermo).

Determination of quiescence by fluorescence analyses - Cells (10^4) were harvested, washed twice with PBS and stained with 5 μ g/ml Hoechst 33342 solution for 45 min at 37 °C and then with 100 μ g/ml pyronin Y for 10 min (CUNHA et al., 2012; SHAPIRO, 1981). Fluorescence (λ_{exc} =350 nm, λ_{em} =461 nm and λ_{exc} =488 nm, λ_{em} =550 nm for Hoechst 33342 and pyronin Y, respectively) was measured in a microplate reader (TECAN Infinity), and the relative RNA quantity was calculated with the pyronin Y/Hoechst 33342 fluorescence ratio.

Brefeldin A assay - Cells (5×10^5) were plated in 100-mm dishes (TPP), transfected with siRNA duplexes and treated with 2.5 μ g/mL brefeldin A (BFA) for 24, 48 and 72 h (FUJIWARA et al., 1988). Cells were washed and analyzed by crystal violet assay.

Balloon injury in rat carotid artery - Male Wistar rats weighing between 250-300 g were obtained from the facility at the Universidade Federal do Paraná (UFPR). Animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of 100 mg/kg ketamine hydrochloride (Syntec) and 5 mg/kg xylazine hydrochloride (Syntec). Endothelial denudation and intimal lesion of the left carotid artery were performed with a balloon embolectomy catheter (2F Fogarty, Edwards Lifesciences) as previously described (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2004). Briefly, the catheter was inserted through the external carotid artery to the common carotid artery, inflated with 0.2 mL saline and drawn with a rotary motion. After deflation in the common carotid, it was removed.

This procedure was performed three times. Some animals were anesthetized and underwent the procedure without the use of the balloon catheter (sham-operated). Following balloon angioplasty, animals were kept warm, and 0.1 mg/kg scopolamine butylbromide plus 5 mg/kg dipyron (Boehringer Ingelheim) was administered. This protocol was approved by the Research Ethics Committee (CEUA) of the Biological Sciences Building, protocol number 412/2009.

siRNA in vivo transfection—A 10µg aliquot of siRNA duplex (sequences above) was dissolved in 100 µL of a 30% (m/v) pluronic gel (Sigma-Aldrich) solution and perivascularly delivered into the rat carotid artery immediately after injury (WANG et al., 2009). The transfection controls were performed with 10 µg of a control siRNA labeled with TyE (IDT) or 10 µg of pEGFP-C1 (Clontech).

Immunohistochemistry (IHC) and histochemistry—Sham-operated, injured and injured/transfected carotids were collected at 7, 14 and 21 days after balloon catheter injury. Next, 5-µm-thick sections of each specimen were subjected to immunohistochemistry at the same time as previously described (PORTES et al., 2008) with the following polyclonal antibodies: anti-QSOX1 (ZANATA et al., 2005), anti-GFP (a kind donation of Dr. Stenio Perdigão, ICC, Curitiba, Brazil) and anti-PCNA (Santa Cruz Biotechnology). Immunoreactions were developed with a peroxidase mouse and rabbit kit (Diagnostic BioSystems) using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) as a chromogen (Diagnostic BioSystems). QSOX1 expression was quantified by densitometry in 6 random fields of the same section per animal using ImageJ software. For histochemistry assays, tissue sections were stained with Weigert Van Gieson. Images were acquired using an AxioImager Z.2 slide scanner microscope (Zeiss, Germany) controlled by Metafer 4-VSlide software (KAYSER et al., 2013; SKELLY et al., 2007).

Statistical analysis- The *in vitro* results represent the mean \pm S.D. of at least 3 independent experiments. The *in vivo* data are presented as the mean \pm S.E of at least 3 rats. The exact N in each experiment is described in the figure legends. Statistical analyses were performed using a single-mean Student's t-test. Graphs were generated using the GraphPad Prism 6 software program. For all analyses, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

The role of QSOX1 in VSMC proliferation and migration was studied in primary cultures of rat aortic SMC transfected with QSOX1siRNA or with the pCR3.1QSOX1 plasmid. Although our anti-QSOX1 lost its reactivity in western blotting assays, we demonstrated the differential QSOX1 expression by RT-qPCR. By comparing QSOX1 mRNA expression with corresponding controls, knockdown of approximately 50% was achieved 24 h after siRNA transfection and slowly decreased through 48 and 72 h (Fig.1A), while 280% overexpression was achieved after 24 h, decreasing to 150% after 48 h (Fig.1B). We then tested whether QSOX1 knockdown or overexpression would interfere with cell viability, as measured by mitochondrial metabolism. With the exception of the time point 72 h after pCR3.1QSOX1 plasmid transfection, compared with the mock control, no significant alteration was observed (Fig. 1C, D). Overall, this result indicates that modulation of QSOX1 expression is not associated with cell death.

Extracellular QSOX1 has pro-migratory properties in VSMC

Migration was analyzed with the scratch method and with the transwell assay. QSOX1 siRNA-transfected VSMC exhibited a decreased migration rate compared to scrambled siRNA-transfected cells as determined in the scratch assay, for all times analyzed (Fig. 2A). Accordingly, QSOX1 overexpression led to an increased migration rate compared with the mock control (Fig. 2B). These overexpression data reinforce the idea that siRNA effects do not result from off-target effects because they are complementary to the knockdown results. The hypothesis that we were measuring cell proliferation instead of cell migration was excluded, as VSMC did not proliferate when cultivated with 0.1% fetal calf serum for 72 h as measured in the crystal violet assay (data not shown). Migration through transwells confirmed the scratch results. Here, chemotaxis was performed with 10% fetal serum or 20 ng/mL PDGF, a classical chemoattractant agent for VSMC (Fig. 2C, D). These results show that QSOX1 has a pro-migratory effect on VSMC.

The most abundant isoform of QSOX1, the short isoform, is reported to be secreted into the extracellular medium (BENAYOUN et al., 2001; MATSUBA et al.,

2002; ZANATA et al., 2005). In addition, the proteolytic cleavage of the long isoform, which produces a secreted active version of QSOX1, was recently reported (RUDOLF; PRINGLE; BULLEID, 2013). Thus, we asked whether the pro-migrative effect of QSOX1 was due to the secreted isoform, implying an extracellular role. To this end, we suppressed QSOX1 expression and incubated these cells with mQSOX1 or mQSOX1C452S (Fig. 3). Fifty nanomolar mQSOX1 induced migration of QSOX1 siRNA-transfected VSMC for all time points analyzed compared with non-stimulated cells, *i.e.*, QSOX1 siRNA-transfected VSMC cultivated in the absence of mQSOX1. In contrast, the recombinant inactive enzyme mQSOX1C452S had no effect (24 and 72 h) or inhibited migration compared with the non-stimulated cells at 48 h (Fig. 3). Similar results were obtained when the recombinant enzymes were incubated with scrambled siRNA-transfected VSMC. Efficiency analysis of both recombinants in promoting cell migration was statistically performed and showed that the wild type recombinant was significantly more efficient in promoting cell migration than the mutant enzyme for all conditions studied (Fig. 3). These findings show that QSOX1 induces VSMC migration and that this process is dependent on the extracellular sulfhydryl oxidase activity of the enzyme. This extracellular activity is probably derived from a combination of both the amount of mQSOX1 and the endogenous QSOX1 that is being secreted into the media.

Extracellular QSOX1 has pro-proliferative properties in VSMC

Proliferation was assessed with crystal violet staining. QSOX1 siRNA treatment induced a significant decrease in cell proliferation compared with the scrambled control, for all time points measured (Fig. 4A). Consistent with this observation, QSOX1 overexpression produced significant increases in the proliferation of pCR3.1QSOX1-transfected cells (Fig. 4B). Additionally, QSOX1 expression paralleled the expression of PCNA, a marker of cell proliferation (Fig. 4C, D). Overall, these results demonstrate that QSOX1 expression is associated with cellular proliferation. Previous reports indicated that the expression of QSOX1 was associated with cellular quiescence, but recent studies have shown that QSOX1 knockdown inhibits both proliferation and migration of breast (KATCHMAN et al., 2013) and pancreas (KATCHMAN et al., 2011) tumor cells. Because quiescent cells

(in G₀ state) have less cellular RNA than cycling cells (SHAPIRO, 1981), we determined the relative amount of cellular RNA in the cells. The results indicated that the amount of RNA was lower when QSOX1 expression was inhibited and higher when QSOX1 was overexpressed (Fig.4E, F). These data indicate that QSOX1 expression is not associated with the G₀ state in VSMC.

To investigate whether the proliferative effect was due to extracellular QSOX1, we incubated QSOX1 siRNA-transfected VSMC with recombinant wild type mQSOX1. Treatment with 5nM mQSOX1 significantly stimulated proliferation in QSOX1 siRNA-transfected VSMC only 24h after exposure. However, 50 nM mQSOX1 significantly increased proliferation of QSOX1 knockdown cells 24, 48 and 72h after transfection, indicating concentration-dependent mitogenic stimulation (Fig. 5). This result indicates that extracellular QSOX1 induces proliferation. Interestingly, when QSOX1 expression was not suppressed by siRNA, incubation with both 5 and 50 nM mQSOX1 induced significant proliferative effects for all time points analyzed (Fig. 5). The fact that the proliferative effects were more intense in scrambled siRNA-transfected cells compared with QSOX1 siRNA-transfected cells indicates that endogenous secreted QSOX1 also contributed to the proliferative effect. When VSMC were treated with brefeldin A, a drug that blocks protein secretion by disrupting ER-Golgi traffic, proliferation was inhibited as measured with the crystal violet assay (data not shown). Although brefeldin A has multiple targets and even induces cell growth arrest, this may be a result of the blockage of QSOX1 secretion. To investigate whether this extracellular trigger of proliferation by QSOX1 was dependent on the sulfhydryl oxidase activity of the extracellular protein, we incubated scrambled siRNA- and QSOX1 siRNA-transfected VSMC with mQSOX1C452S. The results obtained were very similar to those obtained with mQSOX1. The mutant protein stimulated the proliferation of VSMC, with or without QSOX1 knockdown, significantly at 50 nM (Fig. 5). As 50 nM provided clearer results, the efficiency of 50 nM recombinant protein in promoting proliferation was compared in QSOX1 siRNA- and in scrambled siRNA-transfected cells. Although we found a slightly higher efficiency for the wild type recombinant in comparison with the mQSOX1C452S at 24 and 48 h, the difference was statistically significant only at 24 h (statistical analysis not depicted in Fig.5). Thus, under our experimental conditions, the proliferative effect of QSOX1 in VSMC is triggered by extracellular QSOX1 and does not depend

on its sulfhydryl oxidase activity.

Contribution of QSOX1 to neointimal growth in balloon-injured rat carotid

To investigate the clinical implications of QSOX1 in VSMC, we analyzed arterial injury by balloon catheter, a more complex model of vascular disease. Injury by balloon catheter in rat carotids led to intimal hyperplasia, with a prominent neointimal layer observed 14 days after the lesion (Supp. Fig. 1). We then analyzed QSOX1 expression by immunohistochemistry. The results indicated that the medial layer expressed a constant low level of QSOX1 through 21 days post-injury. In the neointimal layer, QSOX1 expression increased until 14 days after lesion, when it is maximal, after which it decreases (Fig. 6). Therefore, in contrast with QSOX1 present in media, QSOX1 in the neointima might play a role in neointimal growth. Thus, we next asked whether decreased QSOX1 expression would interfere with the development of the neointima. We employed pluronic gel to perform an *in vivo* transfection of siRNA and knockdown QSOX1 expression in the injured carotid. The efficiency of this method was validated by analyzing the transfection of a fluorophore-labelled siRNA and of GFP expression in the rat carotid 48 h after transfection of a plasmid bearing the GFP gene. The results indicated that siRNA-TyE (data not shown) and the perivascularly-delivered plasmid reached the medial cells (Supp. Fig. 2). Transfection of siRNA specific for the QSOX1 gene immediately after the balloon injury induced decreased QSOX1 protein expression by approximately 50% at days 14 and 21 compared with the scrambled siRNA (Fig. 7). Thus, pluronic gel-mediated siRNA transfection provided sustained QSOX1 knockdown *in vivo*, as previously described (WANG et al., 2009). Finally, analysis of the neointima/media area ratio demonstrated that this ratio was significantly decreased by ~30% after QSOX1 knockdown in injured arteries at day 21 compared with the scrambled control (Fig. 8). As neointima growth is a result of VSMC migration, proliferation and matrix secretion, we assessed whether decreased expression of QSOX1 inhibited cell proliferation. Indeed, the neointimal expression of PCNA was highly inhibited (70% compared with the scrambled control) in the nuclei of QSOX1 knockdown carotids at day 14. Interestingly, at this time, PCNA expression was maximal in the scrambled control arteries, which indicated that scrambled siRNA-transfected neointimal cells were

actively dividing on day 14 (Fig. 9). Collectively, these data demonstrate that QSOX1 contributes to neointima thickening after balloon injury in rat carotids.

DISCUSSION

To investigate the role of QSOX1 in VSMC, we first modulated its expression by QSOX1 siRNA or QSOX1 plasmid.

Our *in vitro* results clearly demonstrate that QSOX1 knockdown inhibits VSMC migration, while QSOX1 overexpression enhances it. These results are in agreement with recent findings (KATCHMAN et al., 2011, 2013) demonstrating that QSOX1 knockdown inhibits tumor cell invasion. Migration is one step of the invasion process, and those authors proposed that QSOX1 post-translationally activates MMP-2 and MMP-9. Although here we did not investigate the mechanisms underlying the pro-migratory role of QSOX1 in VSMC, some hypotheses, in addition to that reported (KATCHMAN et al., 2011, 2013), can be proposed. Given that the pro-migratory function depends on sulfhydryl oxidase activity, QSOX1 may introduce disulfide bonds in extracellular substrates such as ECM proteins or exofacial thiol proteins, triggering migration. The importance of the ECM in cell adhesion and migration is well known, and ECM dysfunction underlies vascular pathologies (BATCHELOR; ROBINSON; STRAUSS, 1998; LEMARIÉ; THARAUX; LEHOUX, 2010; RODRÍGUEZ et al., 2008; SIEFERT; SARKAR, 2012). Indeed, while our work was in progress, the Fass group demonstrated that QSOX1 knockdown in WI38 fibroblasts led to a decreased number of cells in the monolayer compared with scrambled control fibroblasts (ILANI et al., 2013). The addition of active recombinant QSOX1 prevented this effect, while the inactive mutant did not. The interpretation of these results was that QSOX1 knockdown impairs the adhesive capacity of the fibroblasts by limiting the incorporation of laminin into the ECM, a process supported by extracellular QSOX1 activity (ILANI et al., 2013). Exofacial thiol proteins may also be targets of QSOX1, as some of these contain redox-regulated cysteine residues (JIANG et al., 1999; LARAGIONE et al., 2003; MATTHIAS et al., 2002; SAHAF et al., 2003), which can regulate cell functions (LARAGIONE et al., 2003; MATTHIAS et al., 2002). Finally, hydrogen peroxide, the product of QSOX1 catalysis, could also activate

intracellular redox signaling, mimicking that triggered by PDGF (SUNDARESAN et al., 1995b), leading to VSMC migration (for a review, see (SAN MARTÍN; GRIENDLING, 2010).

Additionally, here we also showed that QSOX1 has a pro-proliferative role in VSMC. While QSOX1 knockdown leads to a decreased number of cells compared with the scrambled control, QSOX1 overexpression increases the amount of VSMC 24 h after siRNA transfection. One could interpret this finding as indicating that QSOX1 is pro-survival, as has already been described for PC12 cells (MOREL et al., 2007) or similar to the small sulfhydryl oxidase ALR in hepatocytes (THIRUNAVUKKARASU et al., 2008). However, compared with the scrambled control, QSOX1 knockdown also promoted decreased PCNA expression and decreased relative RNA content in VSMC, indicating that suppression of QSOX1 expression results in less cell cycle activity. In agreement with this, QSOX1 overexpression led to increased PCNA expression and increased RNA content. Collectively, these data support the concept that QSOX1 is mitogenic, stimulating the entrance of VSMC into the cell cycle. QSOX1 upregulation has long been associated with a reversible quiescent state in several cell lines, such as WI38 fibroblasts (COPPOCK et al., 2000, 1993), endothelial cells (COPPOCK et al., 2000; HELLEBREKERS et al., 2007) and endometrial cells (MUSARD et al., 2001). However, more recent data have shown that QSOX1 expression may also be positively correlated with prostate (OUYANG et al., 2005; SONG et al., 2010), pancreas (ANTWI et al., 2009) and breast (KATCHMAN et al., 2013; SOLOVIEV et al., 2013) tumor progression, likely because expression of QSOX1 promotes tumor cell proliferation and invasion (KATCHMAN et al., 2011, 2013), which is in agreement with our findings. The fact that proliferation did not appear to depend on sulfhydryl oxidase activity suggests that QSOX1 could be acting as a growth factor, similar to ALR, which binds to a receptor to trigger mitogenic signaling (WANG et al., 1999). So far, the mechanism underlying QSOX1-induced mitogenesis remains completely unknown. Thus, it seems that QSOX1 promotes VSMC proliferation and migration but in an independent manner. *In vivo*, it has already been demonstrated that VSMC proliferation and migration after balloon injury are independent processes (CLOWES; SCHWARTZ, 1985).

Our *in vivo* results demonstrate that QSOX1 participates in neointimal

formation, as QSOX1 knockdown via siRNA delivery immediately after carotid injury induces a significant decrease in neointima thickness at day 21. Neointimal growth is a complex process, requiring the activity of countless molecules (FERNES; AVADES, 2000). Therefore, it is not unexpected that the knockdown of a single protein does not completely block such a process but rather impairs it. In agreement with this, QSOX1 knockdown led to decreased expression of PCNA in neointimal cells at day 14 compared with scrambled siRNA-transfected injured artery, indicating that QSOX1 controls cell proliferation, either directly or indirectly. Because QSOX1 expression within the media layer was not altered by 21 days after lesion formation, the initial migration and/or proliferation of medial VSMC to the intima is most likely induced by factors other than QSOX1, such as PDGF, bFGF, other growth factors or other cytokines. Indeed, it was previously shown that PDGF stimulates SMC proliferation and migration during the first 7 days after endothelial denudation (JAWIEN et al., 1992). Our results revealed that cells forming the early neointimal layer express QSOX1 at day 7, and this expression peaks at day 14. Therefore, we suggest that between 7 and 14 days post-injury, neointimal-secreted QSOX1 induces medial cell migration to the intima and proliferation and then activates neointimal cell proliferation in an autocrine manner, as described for ALR in hepatocytes (LI et al., 2001). Thus, the role of QSOX1 in neointimal growth is not immediate; rather, it is associated with its expression by neointimal cells. Suppression of QSOX1 expression by these cells inhibits VSMC migration and proliferation primarily at days 7 and 14, leading to an observable and significantly reduced intima/media area ratio only at day 21.

In conclusion, our *in vitro* and *in vivo* results provide clear evidences that QSOX1 positively regulates proliferation and migration of VSMC, thus contributing to neointima growth induced by balloon injury. Importantly, the relatively modest extent of the effects promoted by QSOX1 knockdown implies that QSOX1 does not play solitary roles in proliferation and migration but rather collaborates with other molecules in such processes. Therefore, our data indicate novel roles for QSOX1 in a disease-related model of vascular repair after injury.

Acknowledgments

This work was supported by INCT Redoxoma, Fundação Araucária, CNPq and Ligue contre le cancer (France). The authors thank Joselito Getz for performing the initial *in vivo* experiments and Dr. Stenio Perdigão and Dr. Lucia de Noronha for providing the anti-GFP and the anti-PCNA antibodies, respectively. Fellowships from CAPES (awarded to BEB, ARC, CAS) and CNPq (awarded to SMZ, FRML, LSN) are also acknowledged.

REFERENCES

- ACCORSI-MENDONÇA, D. et al. The balloon catheter induces an increase in contralateral carotid artery reactivity to angiotensin II and phenylephrine. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 1, p. 79–88, maio 2004.
- AMIOT, C. et al. Expression of the secreted FAD-dependent sulfhydryl oxidase (QSOX) in the guinea pig central nervous system. **Molecular Brain Research**, v. 125, n. 1-2, p. 13–21, 18 jun. 2004.
- ANTWI, K. et al. Analysis of the plasma peptidome from pancreas cancer patients connects a peptide in plasma to overexpression of the parent protein in tumors. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 10, p. 4722–31, out. 2009.
- BATCHELOR, W. B.; ROBINSON, R.; STRAUSS, B. H. The extracellular matrix in balloon arterial injury: a novel target for restenosis prevention. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 41, n. 1, p. 35–49, 1998.
- BENAYOUN, B. et al. Rat seminal vesicle FAD-dependent sulfhydryl oxidase. Biochemical characterization and molecular cloning of a member of the new sulfhydryl oxidase/quiescin Q6 gene family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 17, p. 13830–7, 27 abr. 2001.
- BORGES, B. E. et al. De novo galectin-3 expression influences the response of melanoma cells to isatin-Schiff base copper (II) complex-induced oxidative stimulus. **Chemico-biological interactions**, v. 206, n. 1, p. 37–46, 27 ago. 2013.
- CHAKRAVARTHI, S. et al. Intracellular catalysis of disulfide bond formation by the human sulfhydryl oxidase, QSOX1. **The Biochemical Journal**, v. 404, n. 3, p. 403–11, 15 jun. 2007.
- CHU, G.; HAYAKAWA, H.; BERG, P. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. **Nucleic acids research**, v. 15, n. 3, p. 1311–26, fev. 1987.

CLOWES, A. W.; SCHWARTZ, S. M. Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. **Circulation Research**, v. 56, n. 1, p. 139–145, 1 jan. 1985.

CLOWES, A. W. et al. Regulation of smooth muscle cell growth in injured artery. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 14 Suppl 6, p. S12–15, jan. 1989.

COPPOCK, D. et al. Regulation of the quiescence-induced genes: quiescin Q6, decorin, and ribosomal protein S29. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, n. 2, p. 604–10, 16 mar. 2000.

COPPOCK, D. L. D. L. et al. Preferential Gene Expression in Quiescent Human Lung Fibroblast. **Cell Growth & Differentiation**, v. 4, n. June, p. 483–493, 1993.

COPPOCK, D. L.; THORPE, C.; LIEBERT, M. A. Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, n. 3-4, p. 300–11, 2006.

CUNHA, E. S. et al. Melanogenesis stimulation in B16-F10 melanoma cells induces cell cycle alterations, increased ROS levels and a differential expression of proteins as revealed by proteomic analysis. **Experimental cell research**, v. 318, n. 15, p. 1913–25, 10 set. 2012.

DE ANDRADE, C. R. et al. Quiescin sulfhydryl oxidase (QSOX) is expressed in the human atheroma core: possible role in apoptosis. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 47, n. 10, p. 716–27, dez. 2011.

FERNS, G. A.; AVADES, T. Y. The mechanisms of coronary restenosis: insights from experimental models. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 81, n. 2, p. 63–88, abr. 2000.

FUJIWARA, T. et al. Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 34, p. 18545–52, 5 dez. 1988.

HECKLER, E. J. et al. Generating disulfides with the Quiescin-sulfhydryl oxidases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, n. 4, p. 567–77, abr. 2008a.

HECKLER, E. J. et al. Human quiescin-sulfhydryl oxidase, QSOX1: probing internal redox steps by mutagenesis. **Biochemistry**, v. 47, n. 17, p. 4955–63, 29 abr. 2008b.

HELLEBREKERS, D. M. E. I. et al. Identification of epigenetically silenced genes in tumor endothelial cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 9, p. 4138–48, 1 maio 2007.

HOOBER, K. L. K. L. et al. A Sulfhydryl Oxidase from Chicken Egg White. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 48, p. 30510–30516, 29 nov. 1996.

ILANI, T. et al. A secreted disulfide catalyst controls extracellular matrix composition and function. **Science**, v. 341, n. 6141, p. 74–6, 5 jul. 2013.

JACKSON, C. L. Animal models of restenosis. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 4, n. 3, p. 122–30, 1994.

JAJE, J. et al. A Flavin-dependent Sulphydryl Oxidase in bovine milk. **Biochemistry**, v. 46, n. 45, p. 13031–13040, 2007.

JANISZEWSKI, M. et al. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 49, p. 40813–9, 9 dez. 2005.

KATCHMAN, B. A et al. Quiescin sulphydryl oxidase 1 promotes invasion of pancreatic tumor cells mediated by matrix metalloproteinases. **Molecular Cancer Research**, v. 9, n. 12, p. 1621–31, dez. 2011.

KATCHMAN, B. A et al. Expression of quiescin sulphydryl oxidase 1 is associated with a highly invasive phenotype and correlates with a poor prognosis in Luminal B breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 15, n. 2, p. R28, 28 mar. 2013.

KAYSER, G. et al. Simultaneous multi-antibody staining in non-small cell lung cancer strengthens diagnostic accuracy especially in small tissue samples. **PloS One**, v. 8, n. 2, p. e56333, jan. 2013.

KUSMA, J. et al. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie**, v. 90, n. 11-12, p. 1722–1736, 2008.

LARAGIONE, T. et al. Redox regulation of surface protein thiols: identification of integrin alpha-4 as a molecular target by using redox proteomics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 25, p. 14737–41, 9 dez. 2003.

LEE, M. Y. et al. Mechanisms of vascular smooth muscle NADPH oxidase 1 (Nox1) contribution to injury-induced neointimal formation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 29, n. 4, p. 480–7, abr. 2009.

LEITE, P. F. et al. Redox processes underlying the vascular repair reaction. **World Journal of Surgery**, v. 28, n. 3, p. 331–6, mar. 2004.

LEMARIÉ, C. A.; THARAUX, P.-L.; LEHOUX, S. Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 48, n. 3, p. 433–9, mar. 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.

MAIRET-COELLO, G. et al. FAD-linked sulphydryl oxidase QSOX: topographic, cellular, and subcellular immunolocalization in adult rat central nervous system. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 473, n. 3, p. 334–63, 31 maio 2004.

MATSUBA, S. et al. Sulfhydryl oxidase (SOx) from mouse epidermis: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of recombinant protein in the cultured cells. **Journal of Dermatological science**, v. 30, n. 1, p. 50–62, out. 2002.

MATTHIAS, L. J. et al. Disulfide exchange in domain 2 of CD4 is required for entry of HIV-1. **Nature Immunology**, v. 3, n. 8, p. 727–32, ago. 2002.

MCMURRAY, H. F.; PARROTT, D. P.; BOWYER, D. E. A standardised method of culturing aortic explants, suitable for the study of factors affecting the phenotypic modulation, migration and proliferation of aortic smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, v. 86, n. 2-3, p. 227–37, fev. 1991.

MEBAZAA, A. et al. Unbiased plasma proteomics for novel diagnostic biomarkers in cardiovascular disease: identification of quiescin Q6 as a candidate biomarker of acutely decompensated heart failure. **European Heart journal**, v. 33, n. 18, p. 2317–24, set. 2012.

MOREL, C. et al. Involvement of sulfhydryl oxidase QSOX1 in the protection of cells against oxidative stress-induced apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 313, n. 19, p. 3971–82, nov. 2007.

MUSARD, J. F. et al. Identification and expression of a new sulfhydryl oxidase SOx-3 during the cell cycle and the estrus cycle in uterine cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 287, n. 1, p. 83–91, 14 set. 2001.

NALIWAIKO, K. et al. Guanosine promotes B16F10 melanoma cell differentiation through PKC-ERK 1/2 pathway. **Chemico-Biological Interactions**, v. 173, n. 2, p. 122–8, 28 maio 2008.

OUYANG, X. et al. Loss-of-Function of Nkx3 . 1 Promotes Increased Oxidative Damage in Prostate Carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 65, n. 15, p. 6773–6779, 2005.

PORTES, K. F. et al. Tissue distribution of quiescin Q6/sulfhydryl oxidase (QSOX) in developing mouse. **Journal of Molecular Histology**, v. 39, n. 2, p. 217–25, abr. 2008.

RADOM, J. et al. Identification and expression of a new splicing variant of FAD-sulfhydryl oxidase in adult rat brain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1759, n. 5, p. 225–33, maio 2006.

RAJE, S.; GLYNN, N. M.; THORPE, C. A continuous fluorescence assay for sulfhydryl oxidase. **Analytical Biochemistry**, v. 307, n. 2, p. 266–72, 15 ago. 2002.

RANCY, P. C.; THORPE, C. Oxidative Protein Folding in vitro: a Study of the Cooperation between Quiescin-sulfhydryl Oxidase and Protein Disulfide Isomerase. **Biochemistry**, v. 47, n. 46, p. 12047–12056, 18 nov. 2010.

RODRÍGUEZ, C. et al. Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in cardiovascular diseases. **Cardiovascular Research**, v. 79, n. 1, p. 7–13, jul. 2008.

RUDOLF, J.; PRINGLE, M. A; BULLEID, N. J. Proteolytic processing of QSOX1A ensures efficient secretion of a potent disulfide catalyst. **The Biochemical Journal**, v. 454, n. 2, p. 181–90, 1 set. 2013.

SAHAF, B. et al. Lymphocyte surface thiol levels. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 7, p. 4001–5, abr. 2003.

SAN MARTÍN, A.; GRIENDLING, K. K. Redox Control of Vascular Smooth Muscle Migration. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 5, p. 625–40, 1 mar. 2010.

SHAPIRO, H. M. Flow cytometric estimation of DNA and RNA content in intact cells stained with Hoechst 33342 and pyronin Y. **Cytometry**, v. 2, n. 3, p. 143–50, nov. 1981.

SIEFERT, S. A.; SARKAR, R. Matrix metalloproteinases in vascular physiology and disease. **Vascular**, v. 20, n. 4, p. 210–6, ago. 2012.

SIMPER, D. et al. Comparative proteomics profiling reveals role of smooth muscle progenitors in extracellular matrix production. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 7, p. 1325–32, jul. 2010.

SKELLY, C. L. et al. Attenuated herpes simplex virus 1 blocks arterial apoptosis and intimal hyperplasia induced by balloon angioplasty and reduced blood flow. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 30, p. 12474–8, jul. 2007.

SOLOVIEV, M. et al. Elevated transcription of the gene QSOX1 encoding quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1 in breast cancer. **PloS One**, v. 8, n. 2, p. e57327, jan. 2013.

SONG, H. et al. Loss-of-Nkx3.1 Leads to Activation of Discrete Downstream Target Genes during Prostate Tumorigenesis. **Oncogene**, v. 28, n. 37, p. 3307–3319, 2010.

SUNDARESAN, M. et al. Requirement for Generation of H₂O₂ for Platelet-Derived growth factor signal transduction. **Science**, v. 1288, n. 1993, 1995a.

SZOCS, K. Upregulation of Nox-Based NAD(P)H Oxidases in Restenosis After Carotid Injury. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, n. 1, p. 21–27, 1 jan. 2002.

THORPE, C. et al. Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 405, n. 1, p. 1–12, 1 set. 2002.

WANG, L. et al. ADAMTS-7 mediates vascular smooth muscle cell migration and neointima formation in balloon-injured rat arteries. **Circulation Research**, v. 104, n. 5, p. 688–98, 13 mar. 2009.

ZANATA, S. M. et al. High levels of active quiescin Q6 sulfhydryl oxidase (QSOX) are selectively present in fetal serum. **Redox Report: Communications in Free Radical Research**, v. 10, n. 6, p. 319–23, jan. 2005.

ZHU, S. et al. Targeted disruption of the prostaglandin E2 E-prostanoid 2 receptor exacerbates vascular neointimal formation in mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 8, p. 1739–47, ago. 2011.

FIGURES

FIGURE 1. Effects of QSOX1 knockdown and overexpression on VSMC. QSOX1 mRNA expression in scrambled or QSOX1 siRNA-transfected (A) and in mock or pCR3.1QSOX1-transfected (B) VSMC were evaluated at 24, 48 and 72 h post-transfection. mRNA levels were quantified by quantitative PCR using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Cell viability was assessed by an MTT assay in scrambled and QSOX1 siRNA-transfected (C) or in mock and pCR3.1QSOX1-transfected (D) cells at 24, 48 and 72 h after transfection. Graphical data corresponds to the mean \pm SD of at least 3 independent experiments. Statistically significant differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$) are indicated.

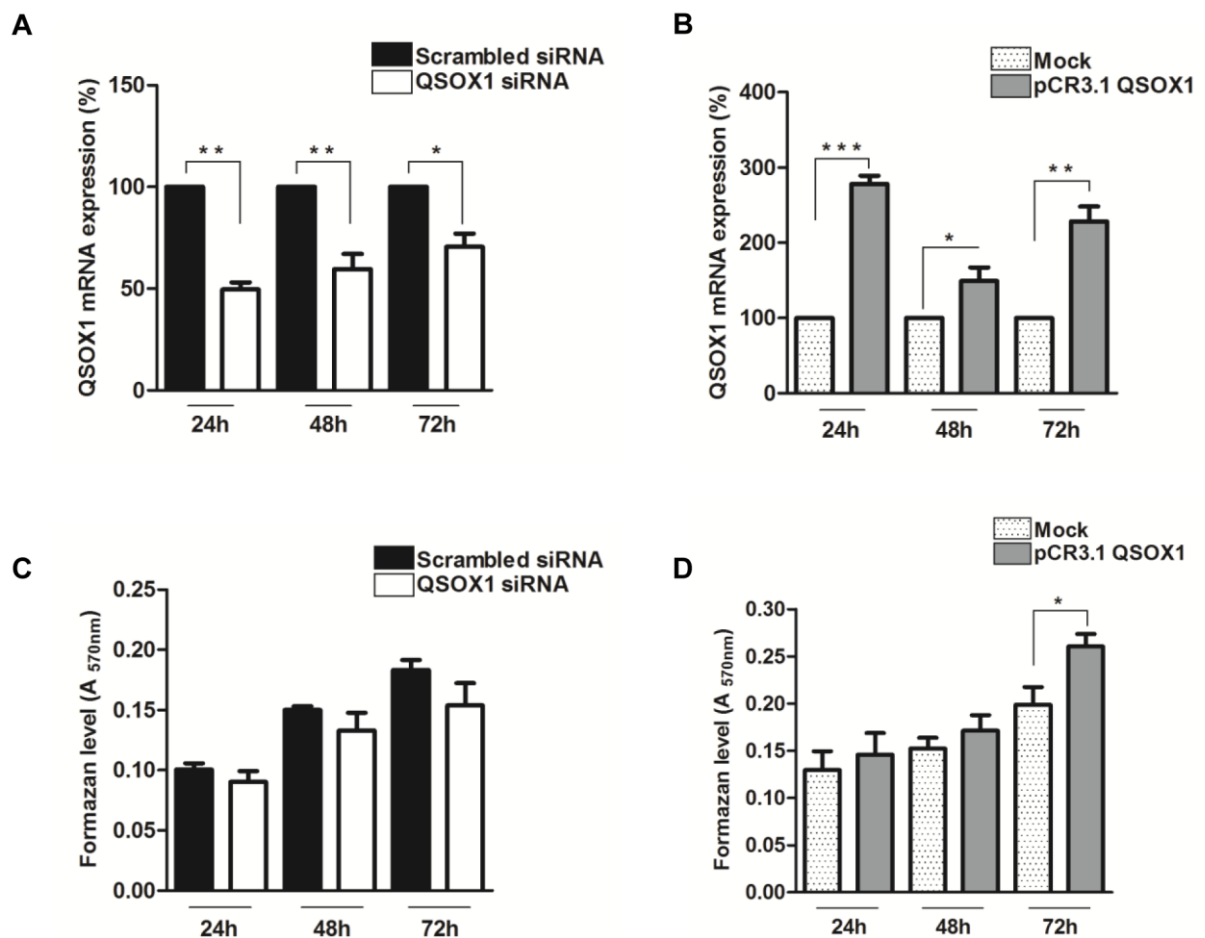


FIGURE 2. Effects of QSOX1 knockdown and overexpression in VSMC migration. Cell migration was assessed by scratch (A, B) and transwell (C, D) assays in scrambled and QSOX1 siRNA-transfected (A, C) and in mock and pCR3.1QSOX1-transfected (B, D) cells at 24, 48 and 72 h after transfection. Migration was calculated as the difference in the distance between the edges of a scratch at the indicated times in relation to the distance measured at time 0. In the transwell assay, migration was calculated as the number of cells attracted by 10% fetal calf serum or by 20 ng/mL PDGF. Data shown correspond to the mean \pm SD of at least 3 independent experiments. Statistically significant differences (* p <0.05, ** p <0.01) are indicated.

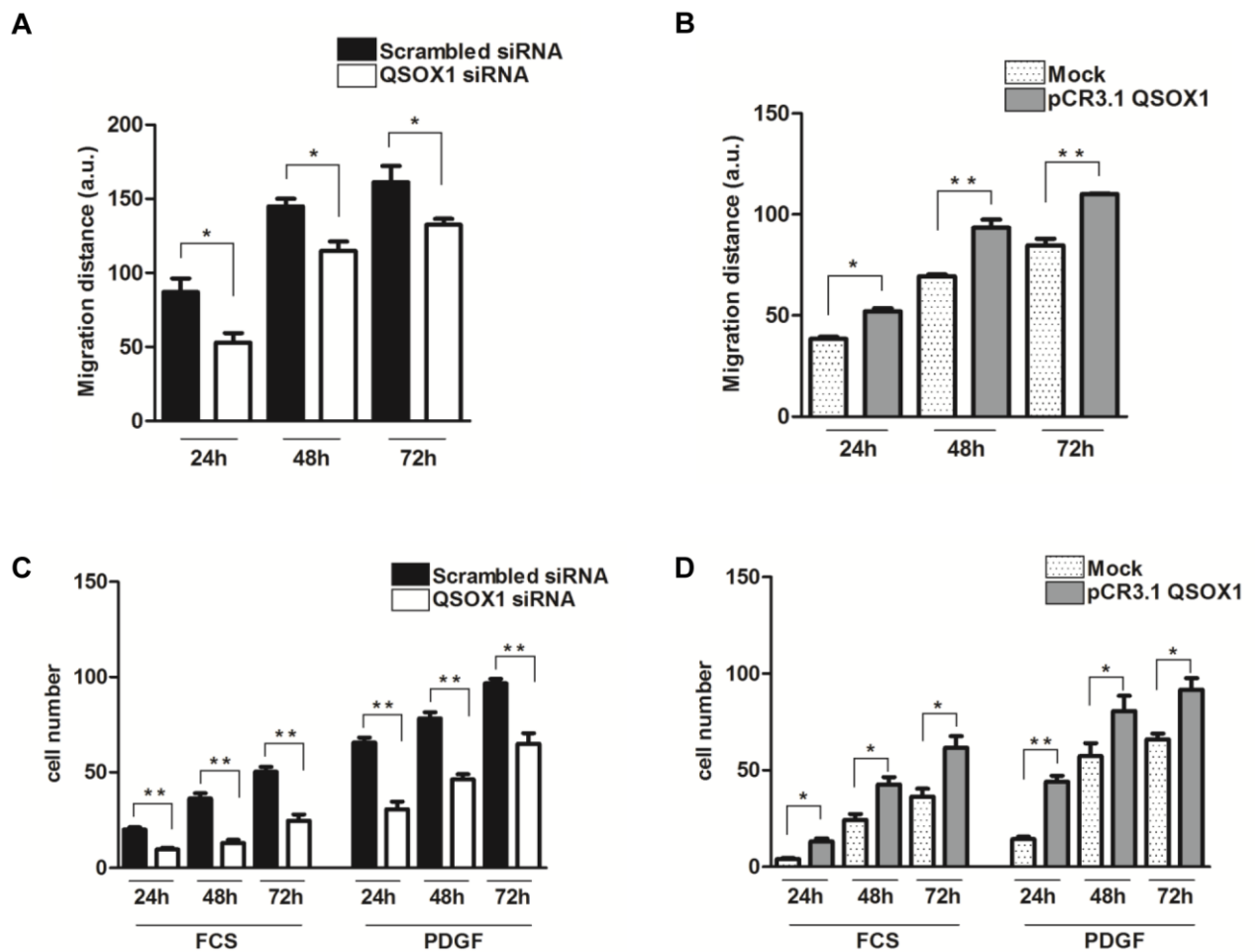


FIGURE 3. Effect of exogenous extracellular recombinant QSOX1 in VSMC migration. Scrambled or QSOX1 siRNA-transfected cells were treated with 50 nM wild type mQSOX1 or the inactive recombinant QSOX1 mutant mQSOX1C452S or were left untreated. After 24, 48 or 72 h of treatment, migration was assessed with the scratch assay. Data shown correspond to the mean \pm SD of at least 3 independent experiments. Statistically significant differences (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.005) are indicated.

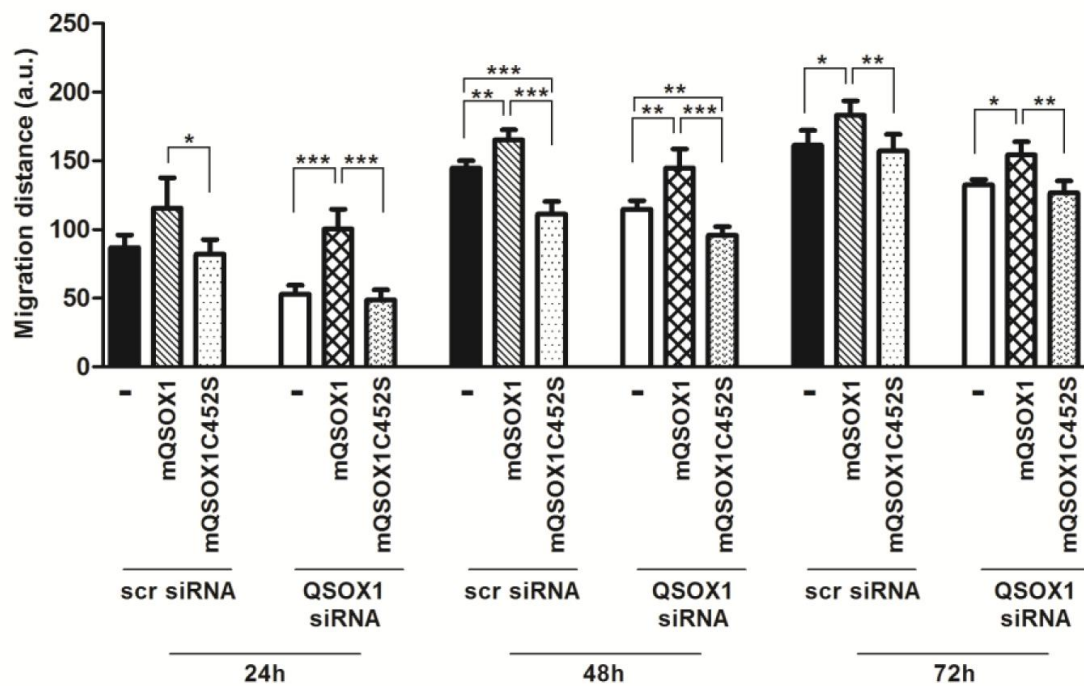


FIGURE 4. Effect of QSOX1 knockdown and overexpression in proliferative events in VSMC. Proliferation was assessed by crystal violet assay (A, B), PCNA expression by immunoblotting (C, D) and relative RNA content by pyronin Y (PY)/Hoechst 33342 fluorescence ratios (E, F) in scrambled and QSOX1 siRNA-transfected (A, C, E) or in mock and pCR3.1QSOX1-transfected (B, D, F) cells at 24, 48 and 72 h after transfection. Graphical data corresponds to the mean \pm SD of at least 3 independent experiments, whereas the immunoblotting data are representative of 3 independent assays. Statistically significant differences (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.005) are indicated.

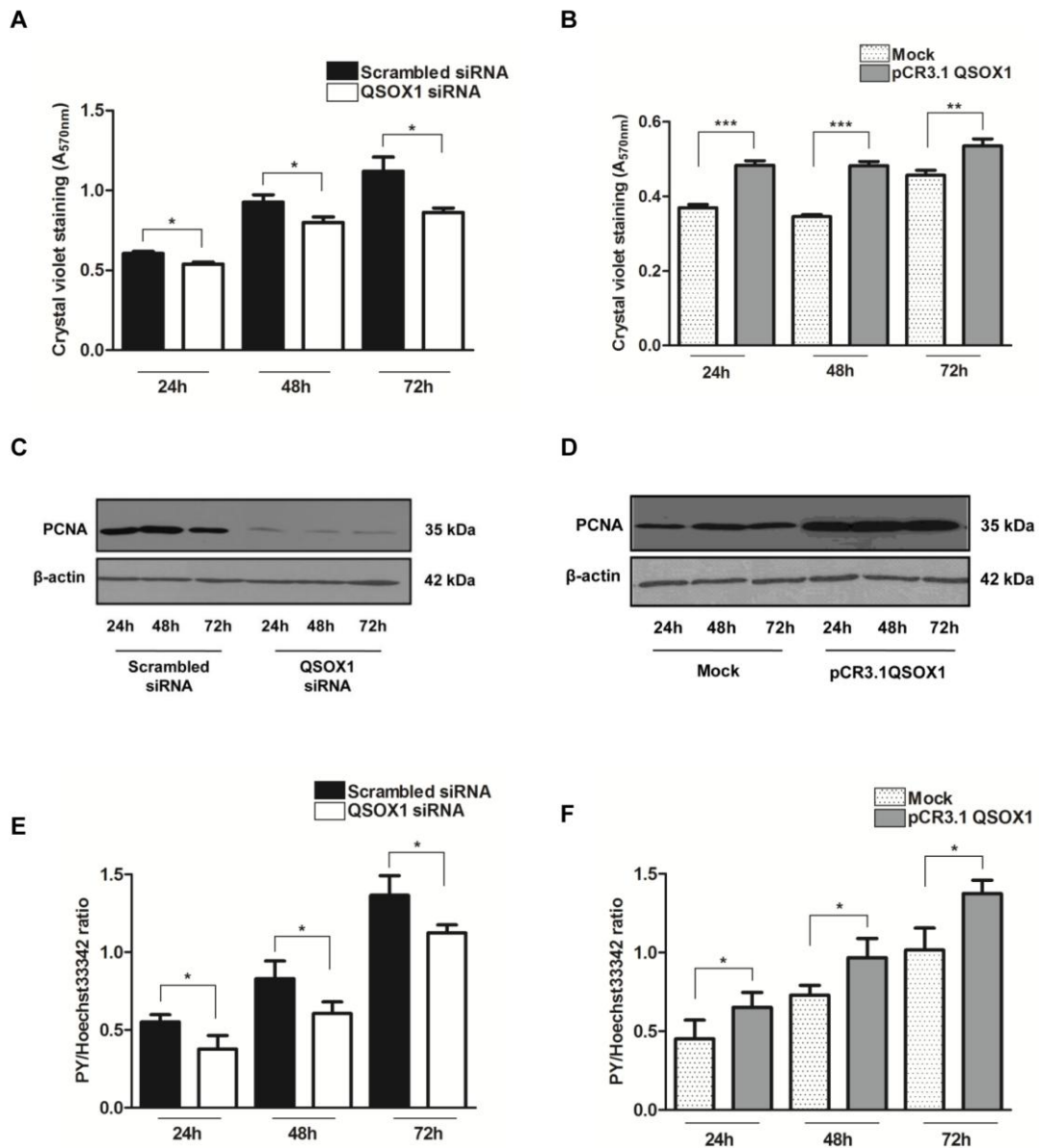


FIGURE 5. Effect of exogenous extracellular recombinant QSOX1 in VSMC proliferation. Scrambled or QSOX1 siRNA-transfected cells were treated with wild type mQSOX1 or with the inactive recombinant QSOX1 mutant mQSOX1C452S at 5 or 50 nM or were left untreated. After 24, 48 or 72 h of treatment, proliferation was assessed by crystal violet assay. Data shown correspond to the mean \pm SD of at least 3 independent experiments. Statistically significant differences (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.005) are indicated.

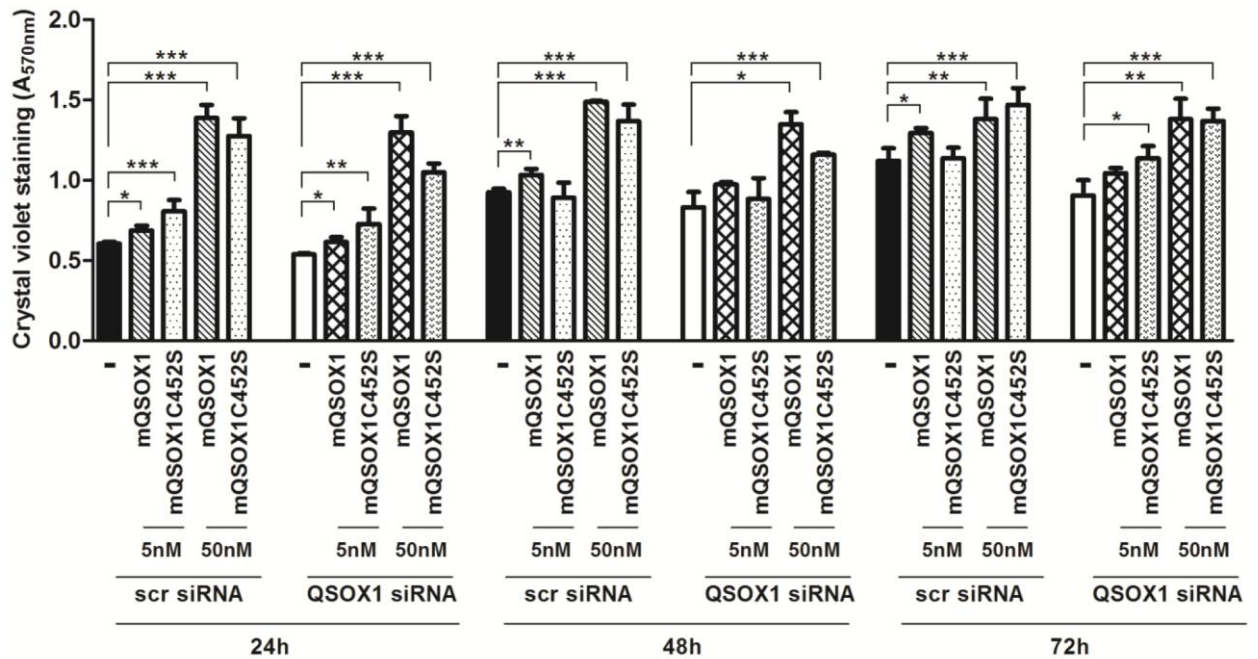


FIGURE 6. QSOX1 expression and quantification in rat carotids after balloon catheter injury. (A) Representative photomicrographs of catheter-injured (n=3) carotid sections immunostained with anti-QSOX1 at 7, 14 and 21 days after the injury. The carotid sections were photographed at 400x magnification. QSOX1 expression was determined in neointima (B) and media (C) layers by densitometry in 6 random fields/rat. The values represent the mean \pm SE. Statistically significant differences ($*p<0.05$) are indicated.

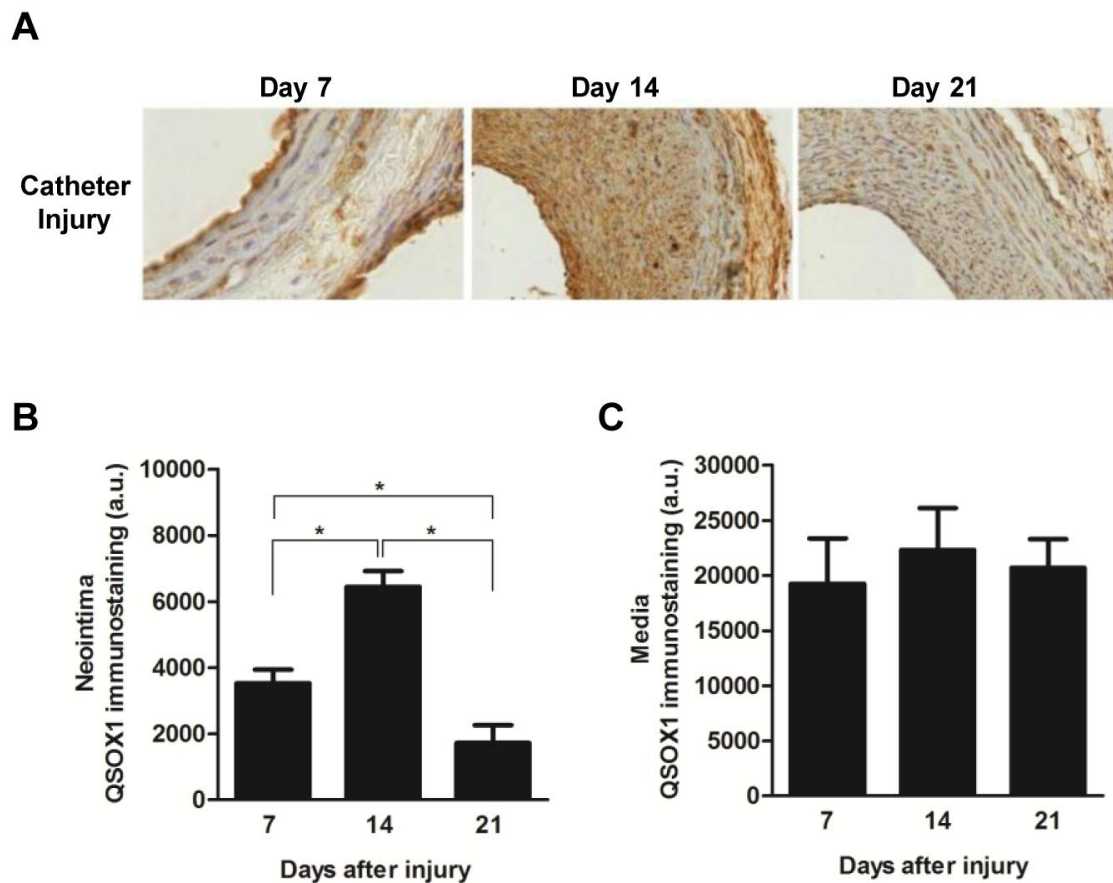


FIGURE 7. QSOX1 expression in neointima after *in vivo* siRNA transfection in rat carotids. Immediately after balloon catheter injury, 10 μ g of scrambled (n=3) or QSOX1 (n=3) siRNA were delivered to the injured artery. At days 7, 14 and 21 after the injury, carotid sections were immunostained with anti-QSOX1, and QSOX1 expression was quantified by densitometry in 6 random fields/rat. The values represent the mean \pm SE. Statistically significant differences (* p <0.05, ** p <0.01) are indicated.

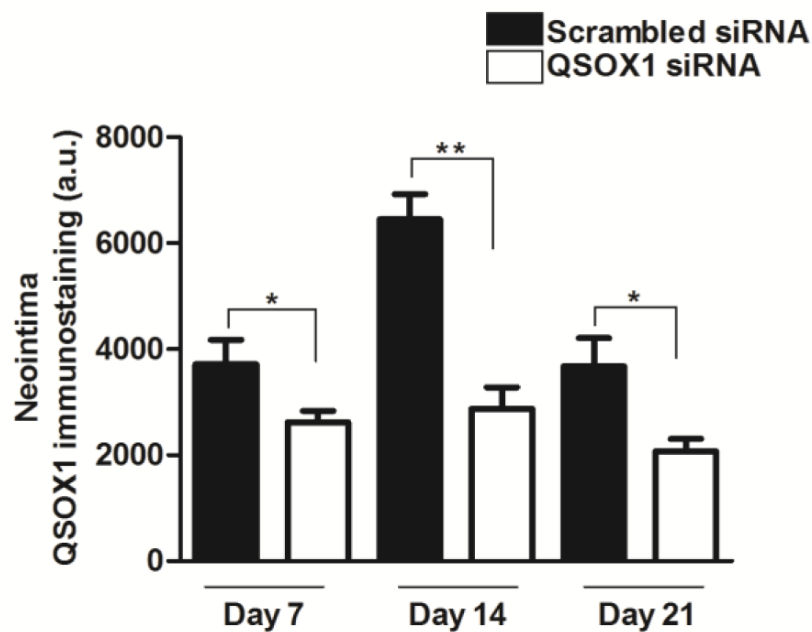


FIGURE 8. Effect of QSOX1 knockdown on the neointima/media area ratio. (A) Representative photomicrographs of scrambled (n=5) or QSOX1 (n=5) siRNA-transfected injured carotid sections, stained with Weigert Van Gieson solution at 7, 14 and 21 days after lesion. The carotid sections were photographed at 400 x magnification. Line indicates tunica media while dot indicates tunica intima or neointima. (B) Areas were measured with Image J software, and neointima/media area ratios were calculated. The values represent the mean \pm SE. The statistically significant difference (* p <0.05) is indicated.

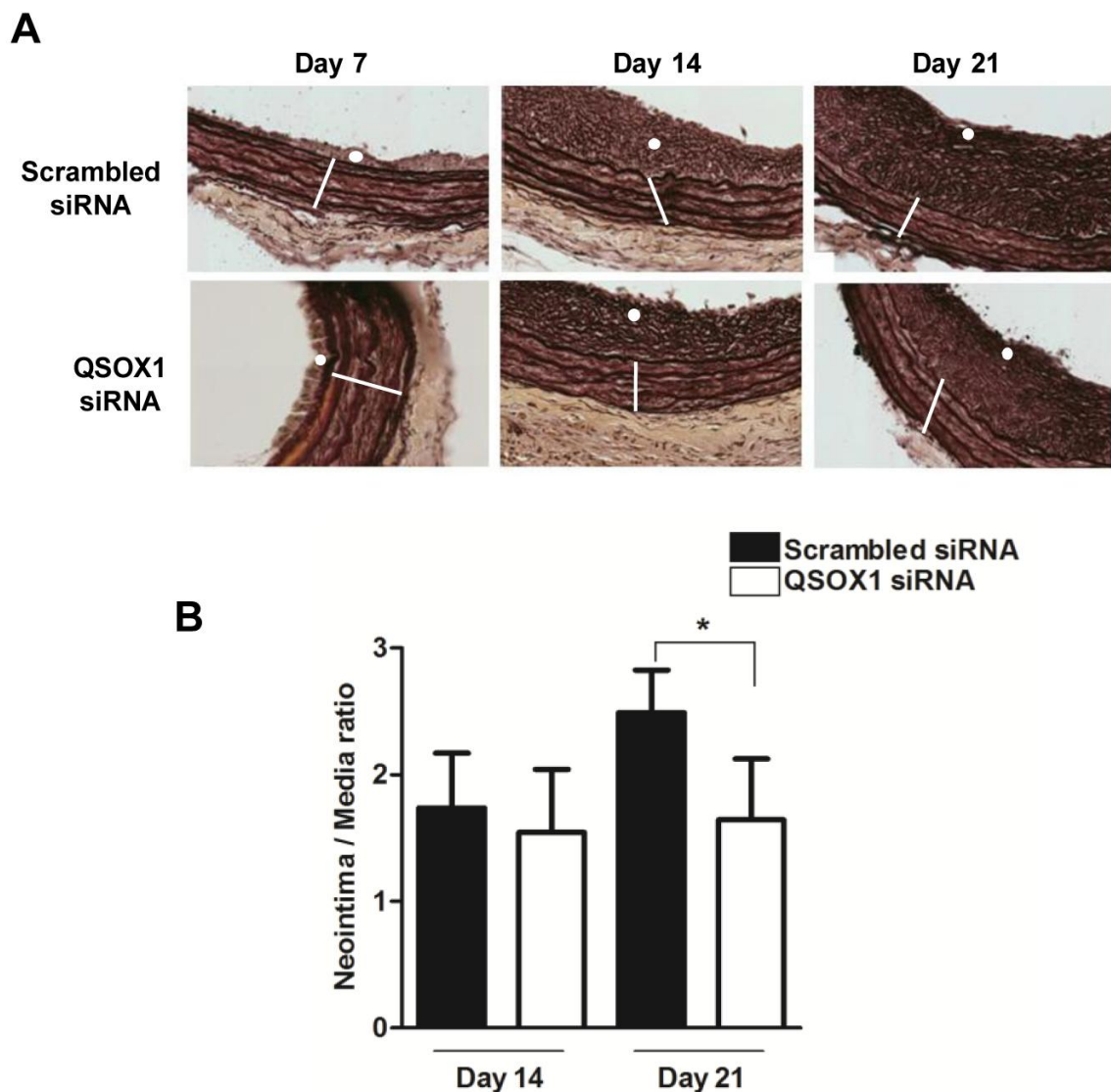
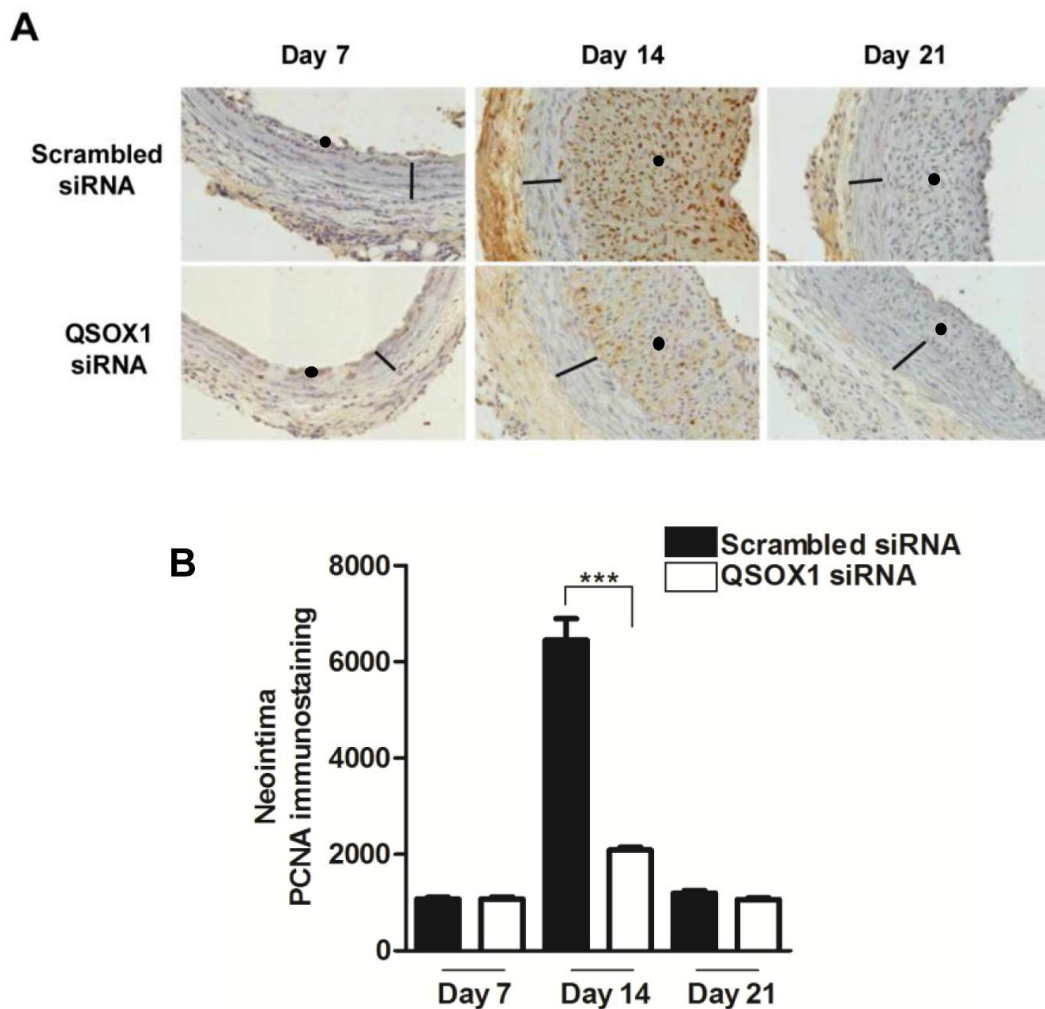
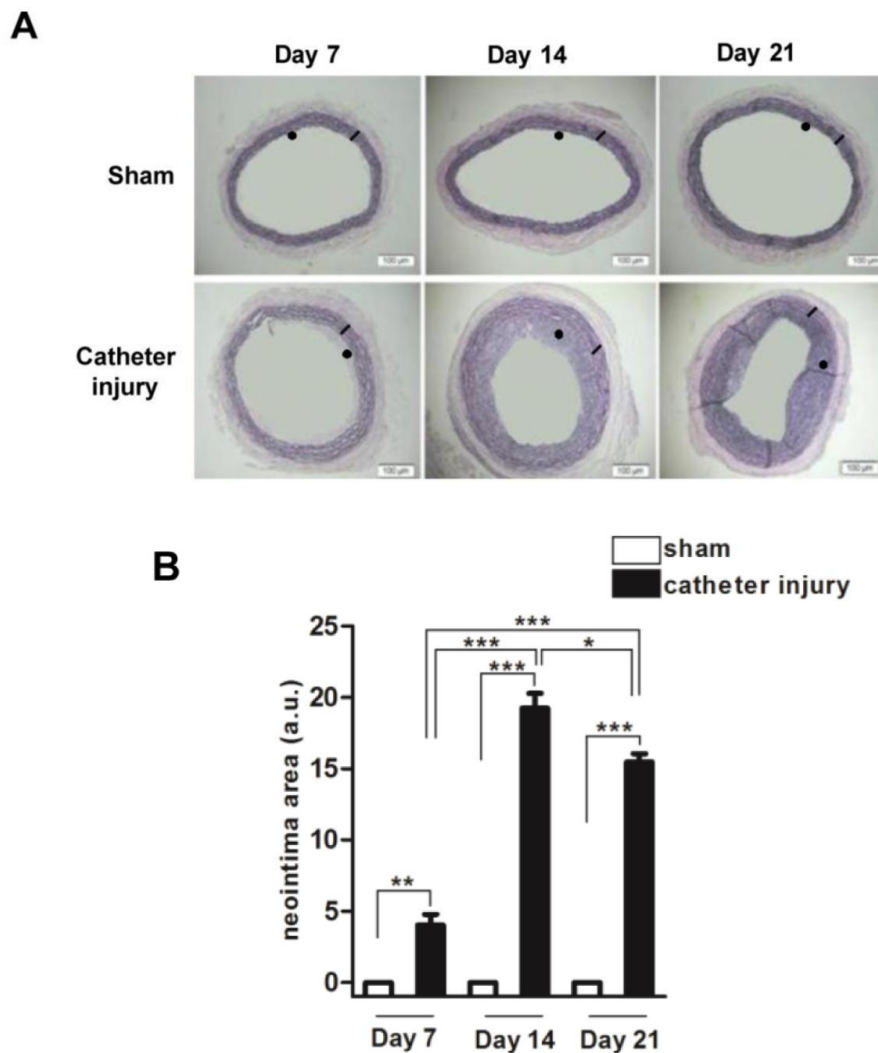


FIGURE 9. Effect of QSOX1 knockdown on PCNA expression in the neointima.

(A) Representative photomicrographs of scrambled (n=3) or QSOX1 (n=3) siRNA-transfected injured carotid sections immunostained with anti-PCNA at 7, 14 and 21 days after the injury. The carotid sections were photographed at 400 x magnification. Line indicates tunica media, while dot indicates tunica intima or neointima. (B) PCNA expression was measured by densitometry in 6 random fields/rat with Image J software. The values represent the mean \pm SE. The statistically significant difference (***) $p < 0.005$ is indicated.

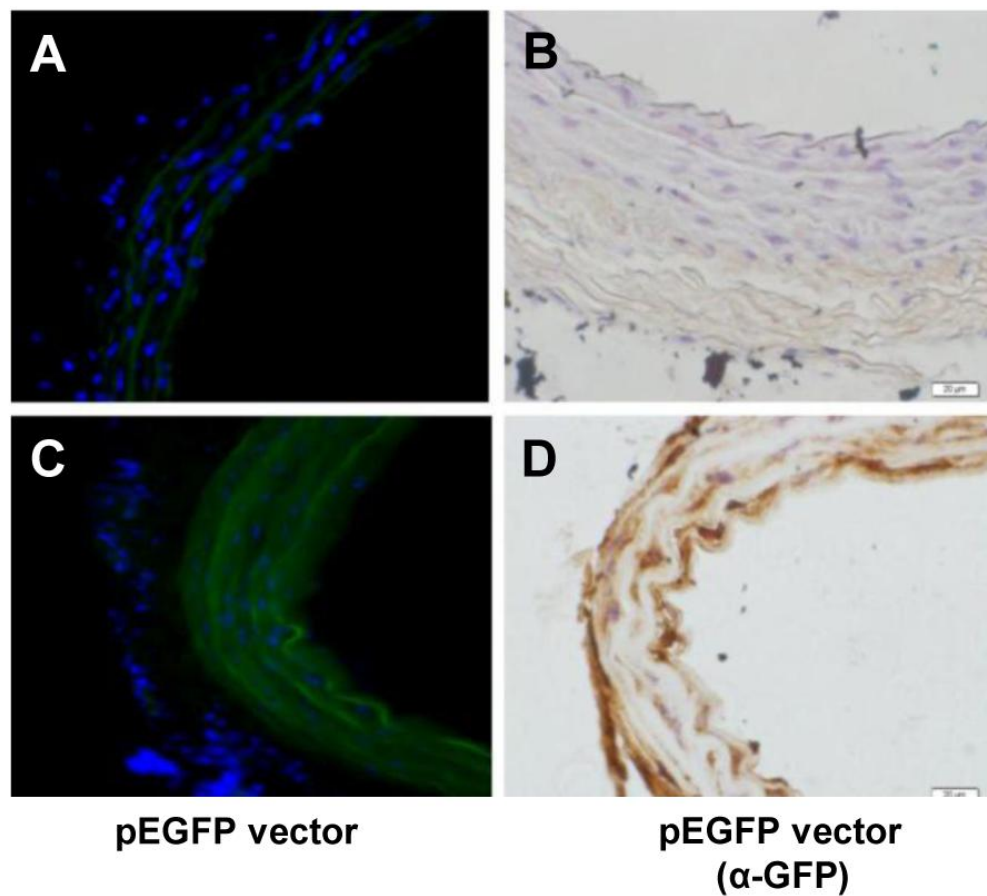


SUPPLEMENTAL FIGURE 1. Neointimal hyperplasia after injury by balloon catheter in rat carotids. (A) Representative photomicrographs of sham (n=3) or catheter-injured (n=3) carotid sections stained with Weigert Van Gieson at 7, 14 and 21 days after lesion formation. Line indicates tunica media, while dot indicates tunica intima (sham control) or neointima (catheter injury). (B) Neointima areas were measured using the Image J program in 6 random fields/rat. The values represent mean \pm SE. Statistically significant differences (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.005) are indicated.



SUPPLEMENTAL FIGURE 2. Efficiency of *in vivo* transfection with pluronic gel.

Carotids (n=2) were transfected with mock (A, B) or with a pEGFP (C, D) vector in a pluronic gel solution that was applied perivascularly. After 48 h, carotid sections were analyzed for GFP expression by green fluorescence (A, C) and by immunohistochemistry using anti-GFP (B, D). Nuclei were stained with DAPI (A, C) or hematoxylin (B, D).



4. RESULTADOS OBTIDOS APÓS ARTIGO

Depois da obtenção dos resultados que estão descritos no artigo resolvemos investigar o mecanismo pela qual a QSOX1 induz a proliferação de VSMCs. Esse interesse surgiu a partir dos resultados que indicaram que QSOX1 promove a proliferação, de forma independente da atividade sulfidril oxidase.

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Purificação das recombinantes em coluna de afinidade por LPS

A purificação das proteínas recombinantes foi realizada primeiramente por cromatografia (resina de agarose) de afinidade a metal imobilizado (Ni^{2+} -NTA (Quiagen), seguindo recomendações do fabricante. Após essa etapa os recombinantes foram passadas por uma coluna para retirada de LPS. Essa metodologia foi realizada exatamente igual descrito pelo fabricante Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel (Thermo Scientific).

4.1.2 Atividade enzimáticas das proteínas recombinantes

A atividade sulfidril oxidase da mQSOX1 e mQSOX1C452S foi determinada pelo método do ácido homovanílico/peroxidase de raiz forte (HVA/HRP) (RAJE, 2002), usando DTT concentrações entre parênteses (25 μM a 250 μM) como substrato. Uma curva padrão com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 μM) foi feita a cada ensaio. A fluorescência da reação foi monitorada pelo fluorímetro Tecan i-control M-200, utilizando os seguintes parâmetros: emissão = 420 nm, excitação = 320 nm, a 25 °C.

4.1.3 Ensaio de proliferação determinado pelo método de Cristal Violeta

As células (5×10^4) foram plaqueadas em microplacas de 96 poços (TPP). Vinte e quatro, 48 e 72 h após o plaqueamento, as células foram recolhidas e analisadas por coloração com violeta de cristal tal como descrito (BORGES et al., 2013). Em alguns ensaios, as proteínas recombinantes ou mQSOX1 e mQSOX1C452S (5 ou 50 nM) foram adicionados para os tempos indicados. A absorvância foi lida a 570 nm em um leitor de microplacas (BioRad, Hercules, CA, EUA). Em alguns ensaios, as células foram incubadas com 200 U / mL de CAT (Sigma-Aldrich, São Paulo, Bra-sil) e / ou 200 U / mL de Peg-CAT (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). Como controle da proliferação foi utilizado PDGF - BB 20 ng /mL (Sigma-Aldrich).

4.2 Resultados

Primeiramente, confirmamos que a proliferação era induzida pelas QSOX1 recombinantes (mQSOX1 e mQSOX1C452S), e não por possível contaminação de LPS. Para isso, passamos as proteínas por uma coluna de remoção de LPS. Isso devido ao fato dessa molécula interferir no processo de proliferação (LIN et al., 2006).

Após a retirada de LPS, refizemos os ensaios de proliferação por cristal violeta (Figura 10).

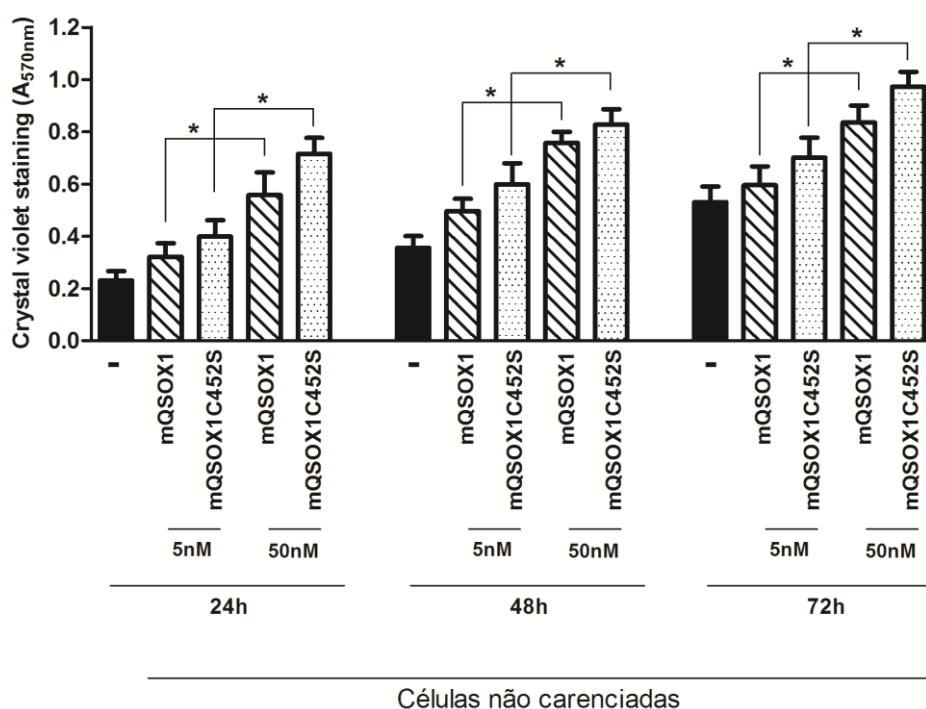


Figura 10: Células VSMC não carenciadas e tratadas com 5 e 50 nM de recombinantes. As células foram plaqueadas e tratadas com duas concentrações de recombinante selvagem (mQSOX1) e mutada (mQSOX1C452S) por 24, 48 e 72 horas. Após esse período foi realizado o ensaio de cristal violeta. Os * $p < 0,05$ mostram a significância em relação a concentração das recombinantes. E todos os tratamentos são significativos em relação a célula que não tem recombinante (controle).

FONTE: O autor (2014).

Os resultados mostraram que a proliferação medida não era decorrente de contaminação por LPS, mas da presença de QSOX1, selvagem e mutada. Este resultado é reforçado pela dependência da concentração na resposta proliferativa. A atividade sulfidril oxidase não faz diferença nesse processo proliferativo, uma vez que não houve diferença na resposta proliferativa entre as duas proteínas recombinantes na mesma concentração. A atividade enzimática das duas recombinantes para QSOX1 estão mostradas na figura 11, e mostram o perfil esperado para estas enzimas.

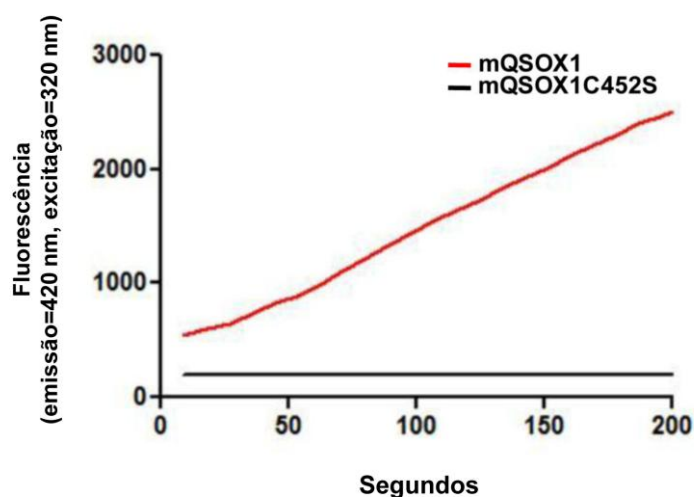


Figura 11: Representação gráfica da produção de H₂O₂ pela oxidação de DTT pelas enzimas mQSOX1 e mQSOX1C452S. Perfil da emissão de fluorescência gerada da oxidação de DTT pelas enzimas selvagem e mutada (100 nM), em relação ao tempo (segundos). O ensaio de atividade sulfidril oxidase foi determinado pelo método de fluorescência contínua (Raje et al., 2002).
 FONTE: O autor (2014).

Para avaliar se o efeito proliferativo induzido pelas QSOX1 era aumentado caso as células estivessem sincronizadas, carenciamos as células por 24 h com 0,1% de SFB. Após esse período adicionamos as recombinantes nas concentrações de 5 e 50 nM por 24, 48 e 72 h e depois realizamos os ensaios de cristal violeta (Figura 12).

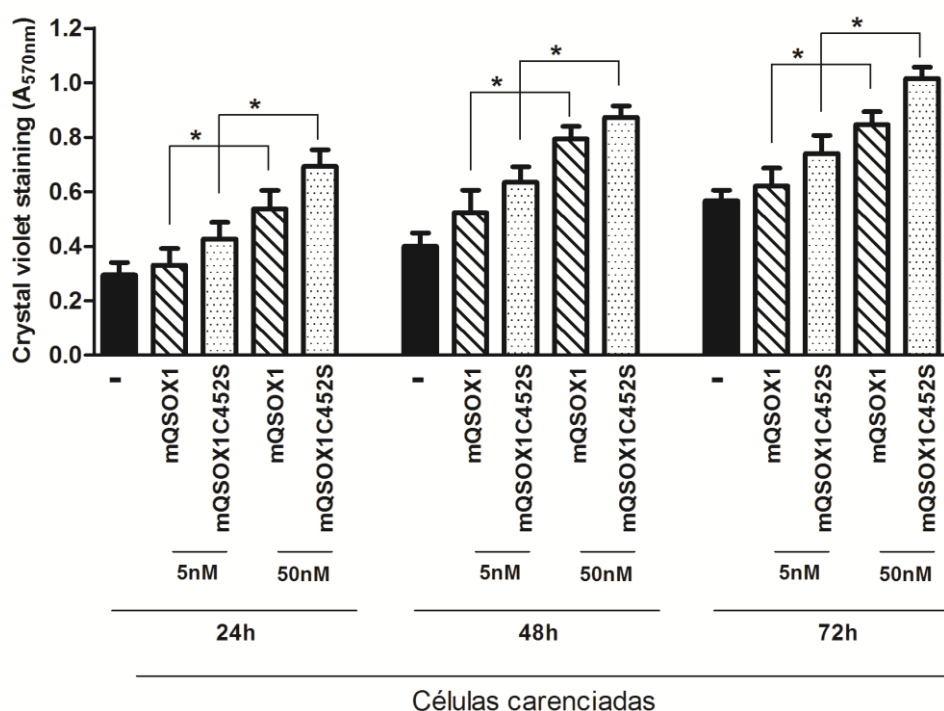


Figura 12: Células VSMC carenciadas com 0,1% de SFB por 24 horas e tratadas com 5 e 50 nM de recombinantes. As células foram plaqueadas, carenciadas com 0,1% de SFB por 24 horas e após esse tempo foram tratadas com duas concentrações de recombinante selvagem (mQSOX1) e mutada (mQSOX1C452S), estas diluídas em meio com 10% de SFB por 24, 48 e 72 horas. Após esse período foi realizado o ensaio de cristal violeta. Os * $p < 0,05$ mostram a significância em relação a concentração das recombinantes. E todos os tratamentos são significativos em relação a célula que não tem recombinante (controle), exceto mQSOX1 5nM em 24, 48 e 72 horas.

FONTE: O autor (2014).

Os resultados mostraram que a proliferação induzida pela QSOX1 não depende do estado de sincronia celular, gerando resultados idênticos aos resultados obtidos com células não carenciadas.

Como o SFB possui diversos fatores mitogênicos, resolvemos avaliar o efeito proliferativo induzido exclusivamente pela QSOX1.

Portanto, refizemos o ensaio de proliferação com células carenciadas por 24 horas e após esse tempo adicionamos as recombinantes diluídas em meio com 0,1% de SFB. Após 24, 48 e 72 horas, fizemos o ensaio de cristal violeta. Utilizamos PDGF para mostrar que as VSMC respondem a este estímulo mitogênico clássico nestas condições experimentais. O que pudemos observar com o resultado é que realmente a proteína QSOX1 participa do processo de proliferação celular de células musculares lisas e é dependente da concentração, pois com 50nM de recombinante

a proliferação é maior. Além disso, podemos observar que essa proliferação é dependente do tempo (Figura 13). Observando a estatística podemos perceber que não tem diferença entre a recombinante selvagem e a mutada na mesma concentração. A diferença é apenas em relação as concentrações diferentes. Podemos perceber também que tem diferença significativa em relação ao controle e as células tratadas com PDGF.

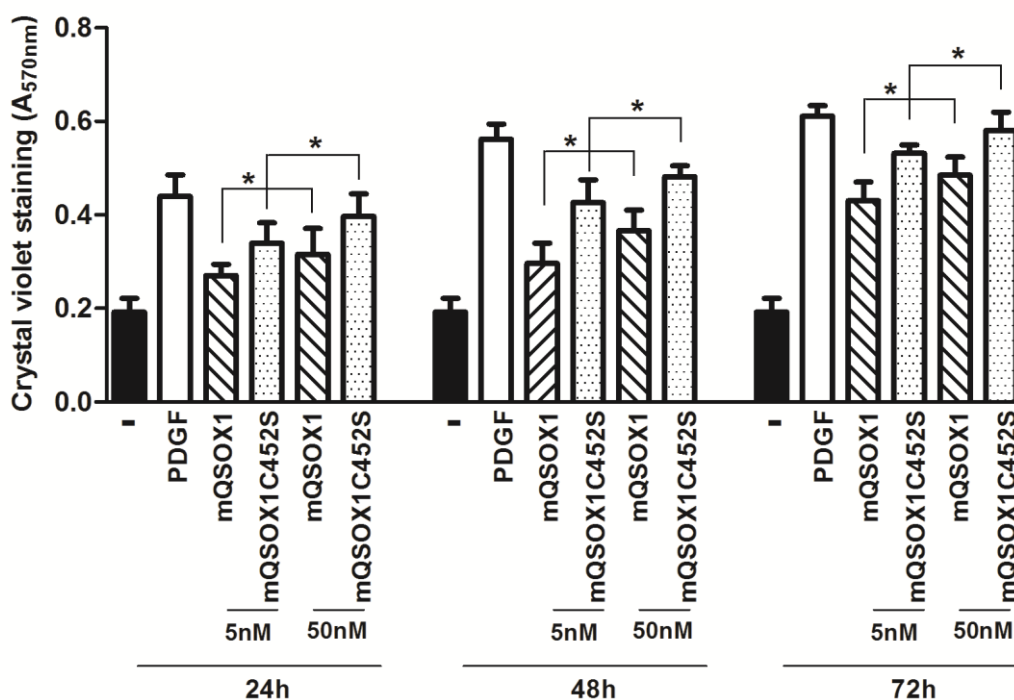


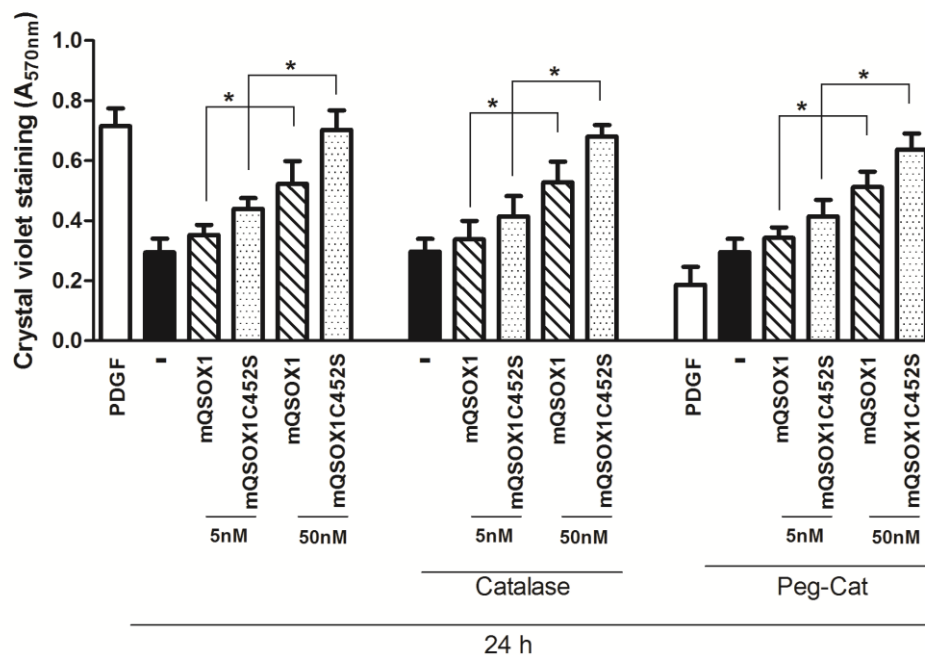
Figura 13: Células VSMC carenciadas com 0,1% de SFB por 24 horas e tratadas com 5 e 50 nM de recombinantes. As células foram plaqueadas, carenciadas com 0,1% de SFB por 24 horas e após esse tempo foram tratadas com duas concentrações de recombinante selvagem (mQSOX1) e mutada (mQSOX1C452S), estas diluídas em meio com 0,1 % de SFB por 24, 48 e 72 horas. Após esse período foi realizado o ensaio de cristal violeta. Os * representam a diferença estatística ($p<0,05$) em relação as diferenças de concentração de recombinantes.

FONTE: O autor (2014).

Finalmente, para avaliar se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido extracelularmente participa da proliferação induzida por QSOX1, tratamos as células com 200 U/ml catalase.

A proliferação de VSMC induzida por mitógenos (LUO et al., 2010), incluindo o PDGF (SUNDARESAN et al., 1995a), demonstra que H_2O_2 é produzido

intracelularmente após a estimulação, e participa da via de sinalização (SUNDARESAN et al., 1995a). Para avaliar se H_2O_2 intracelular participa da proliferação, incubamos as células com 200 U/ml de PEG-cat. Como a catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio, caso o H_2O_2 tenha algum papel extra ou intracelular, a proliferação estimulada pelas recombinantes diminuiria quando as células fossem tratadas com 200 U/ml de catalase ou peg-catalase, respectivamente. O que pudemos observar foi que não houve diferença na proliferação celular entre células não tratadas (Figura 13) e célula tratada seja com cat ou com peg-cat. Em contraste, a proliferação induzida por PDGF é inibida na presença de peg-cat. Estes dados indicam que a proliferação induzida pelas QSOX recombinantes não depende do peróxido de hidrogênio (Figura 14). A análise estatística demonstra que houve diferença significativa entre as concentrações e essas concentrações diferem do controle que é apenas células musculares sem recombinantes.



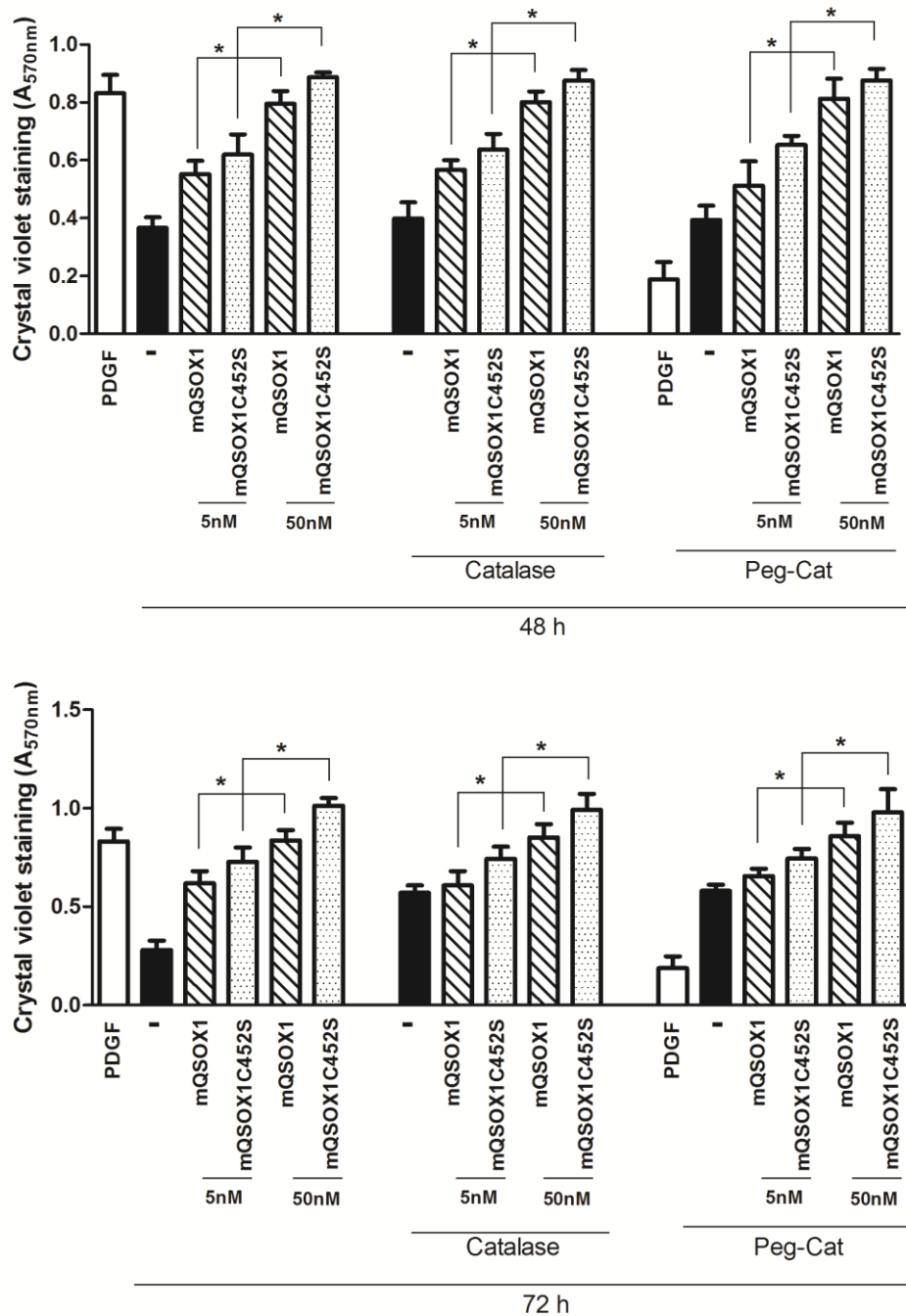


Figura 14: Células VSMC tratadas com 5 e 50 nM de recombinates e Peg-cat e cat. As células foram plaqueadas e tratadas com duas concentrações de recombinante selvagem (mQSOX1) e mutada (mQSOX1C452S), junto com peg-cat e cat em meio com 0,1% de SFB por 24, 48 e 72 horas. Após esse período foi realizado o ensaio de cristal violeta. Os * representam a diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle.

FONTE: O autor (2014)

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos dados indicam que a QSOX1 extracelular (secretada) inicia o processo de proliferação e deve estar agindo como ligante de receptores de membrana, já que a atividade sulfidril oxidase não tem papel nesse processo. Dessa maneira uma possível hipótese é que a QSOX1 estaria funcionando como ligante para o receptor de tirosina quinase (RTK). Na estrutura da QSOX1 tem um domínio chamado de ALR que é um fator de crescimento que estimula a proliferação de hepatócitos para a regeneração do tecido hepático (CHEN et al., 2003).

Receptores ligados a tirosina quinase são um grande e heterogêneo grupo de receptores de membrana respondendo principalmente a mediadores protéicos. Apresentam um domínio extracelular de ligação ao ligante conectado a um domínio intracelular por uma hélice única transmembrana. Em muitos casos, o domínio intracelular é de natureza enzimática (com atividade proteína quinase). Essa família inclui receptores para insulina, citocinas e fatores de crescimento (EGF e VEGF, por exemplo) (LEMMON; SCHLESSINGER, 2010).

Devido à importância biológica das RTKs nos processos de sinalização celular, a sua atividade catalítica deve ser controlada rigorosamente. Alguns dos processos de regulação dessas proteínas são realizados pelo domínio quinase, pois o estado de fosforilação controla a atividade quinase diretamente (HUBBARD; MOHAMMADI; SCHLESSINGER, 1998). Além disso, o estado de fosforilação das tirosinas do receptor influencia a ligação de substratos e outras moléculas adaptadoras, estando também ligado à ação reguladora de proteínas fosfatases (HUNTER, 1995).

Quando ocorre o contato entre o ligante (fator de crescimento) e seu receptor na forma monomérica, ocorre um processo de dimerização, resultando na fosforilação do domínio intracelular, através da reação entre ATP e resíduos de tirosina. Em seguida, ocorre a fosforilação de proteínas-alvo que possuem o domínio SH2, o qual representa um sítio de reconhecimento para as fosfotirosinas. A fosforilação intracelular inicia uma cascata de reações citoplasmáticas que culmina em diversas respostas celulares (LEMMON; SCHLESSINGER, 2010). As reações citoplasmáticas ocorrem através de complexas interações enzimáticas, que constituem as vias de sinalização. As principais vias de sinalização dos fatores de crescimento envolvem a via PI3K/Akt (Fosfatidilinositol 3-quinase/ proteína quinase b) e a via

Ras/Raf/MEK/MAPK, as quais têm funções importantes no crescimento, metabolismo, sobrevivência e divisão celular (MCCUBREY et al., 2007).

As vias Ras/Raf/MEK/MAPK e PI3K/Akt desempenham papéis críticos na transmissão de sinais provenientes dos receptores de fatores de crescimento para regular a expressão gênica e evitar a apoptose. Estas vias interagem entre si para regular o crescimento e, em alguns casos a carcinogênese (MCCUBREY et al., 2007).

Como já mencionado o ALR funciona como um sinalizador para ativar a via de MAP quinase no fígado (LI et al., 2000). Dessa maneira, a nossa hipótese é que possivelmente esse domínio de QSOX1 seja um ligante para ativação, por exemplo, de receptor de tirosina quinase. Esse receptor quando ativado inicia uma cascata de sinalização com fosforilação de diversas proteínas que possivelmente ativem vias que levam a proliferação celular.

Nesse contexto como um todo podemos considerar que nossos resultados com células musculares lisas mostram que a expressão de QSOX1 regula positivamente a proliferação e migração de VSMC, contribuindo, assim, para o crescimento da neointima induzida por cateter balão. O processo da proliferação ocorre sem a participação da atividade sulfidril oxidase da proteína e que possivelmente um domínio da proteína está funcionando como um ligante para ativação de receptores de membrana e dessa forma esse receptor é ativado e desencadeia uma cascata de fosforilação de proteínas levando a proliferação celular através de vias intracelulares como ERK MAPK.

Para elucidar esse mecanismo de proliferação temos como perspectivas fazer fosfoproteômica e identificar quais proteínas estão sendo fosforiladas, assim teremos uma idéia de qual via de sinalização está sendo ativada para que ocorra a proliferação.

O estudo da lesão por cateter balão mostra um aumento na expressão da QSOX1 na neointima. Dessa maneira, podemos concluir que QSOX1 desempenha um papel importante, porém não determinante na proliferação e migração das VSMC, sendo que a diminuição da expressão da QSOX levou a uma diminuição da área da neointima e não aboliu a sua formação da mesma, assim ficando demonstrado que a formação da neointima depende da colaboração com outras moléculas e é multifatorial;

A QSOX1 secretada pelas VSMC estimula as mesmas a migrarem e proliferarem através de sinalização autócrina colaborando para formação da neointima.

Nossos resultados são importantes para compreender os eventos envolvidos na fisiopatologia da reestenose. E mostram novos papéis de QSOX1 em uma condição fisiopatológica não relacionados a situações oncológicas.

6. CONCLUSÕES

- In vitro constatou-se que a expressão de QSOX1 regula positivamente a proliferação e migração de VSMC;
- Ocorreu uma diminuição da migração e proliferação de VSMC após interferência da QSOX1;
- Observou-se um aumento da migração e proliferação de VSMC após a superexpressão de QSOX1;
- O estudo da lesão por cateter balão mostra um aumento na expressão da QSOX1 na neointima;
- In vivo QSOX1 desempenha um papel importante, porém não determinante na proliferação e migração das VSMC, sendo assim a formação da neointima depende da colaboração com outras moléculas;
- Possivelmente a QSOX secretada pelas células musculares lisas da média estimulam as VSMC a migrarem e proliferarem através de sinalização autócrina para a neointima e essas células secretam QSOX fazendo com que proliferem mais;
- Nossos resultados são importantes para compreender os eventos envolvidos na fisiopatologia da reestenose;
- E mostram novos papéis de QSOX1 em uma condição fisiopatológica não relacionados a situações oncológicas

7. REFERÊNCIAS

ALON, A. et al. The dynamic disulphide relay of quiescin sulphhydryl oxidase. **Nature**, v. 488, n. 7411, p. 414–8, 16 ago. 2012.

ANTWI, K. et al. Analysis of the plasma peptidome from pancreas cancer patients connects a peptide in plasma to overexpression of the parent protein in tumors. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 10, p. 4722–31, out. 2009.

BAUTERS, C.; ISNER, J. M. The biology of restenosis. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 40, n. 2, p. 107–16, 1997.

BENAYOUN, B. et al. Rat seminal vesicle FAD-dependent sulfhydryl oxidase. Biochemical characterization and molecular cloning of a member of the new sulfhydryl oxidase/quiescin Q6 gene family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 17, p. 13830–7, 27 abr. 2001.

BENHAR, M. et al. Regulated Protein Denitrosylation by Cytosolic and Mitochondrial Thioredoxins. **Science**, v. 320, n. 5879, p. 1050–1054, 2009.

BERLINER, J. A. et al. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. **Circulation**, v. 91, n. 9, p. 2488–96, 1 maio 1995.

BORGES, B. E. et al. De novo galectin-3 expression influences the response of melanoma cells to isatin-Schiff base copper (II) complex-induced oxidative stimulus. **Chemico-biological interactions**, v. 206, n. 1, p. 37–46, 27 ago. 2013.

BROILLET, M. C. S-nitrosylation of proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, n. 8-9, p. 1036–42, jul. 1999.

CARAMORI, P. R.; YAMAMOTO, G. I.; ZAGO, A. J. [Postangioplasty restenosis. Physiopathogeny]. **Arq Bras Cardiol**, v. 69, n. 2, p. 141–50, ago. 1997.

CHAKRAVARTHI, S. et al. Intracellular catalysis of disulfide bond formation by the human sulfhydryl oxidase, QSOX1. **The Biochemical Journal**, v. 404, n. 3, p. 403–11, 15 jun. 2007.

CHEN, J.-P. et al. Loofa sponge as a scaffold for the culture of human hepatocyte cell line. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 2, p. 522–7, 2003.

CHIARUGI, P.; FIASCHI, T. Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. **Cellular Signalling**, v. 19, n. 4, p. 672–82, abr. 2007.

CLEMPUS, R. E. et al. Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 1, p. 42–8, jan. 2007.

CLOWES, A. W.; CLOWES, M. M. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. IV. Heparin inhibits rat smooth muscle mitogenesis and migration. **Circulation Research**, v. 58, n. 6, p. 839–845, 1 jun. 1986.

CLOWES, A. W.; SCHWARTZ, S. M. Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. **Circulation Research**, v. 56, n. 1, p. 139–145, 1 jan. 1985.

CLOWES, A. W.; REIDY, M. A.; CLOWES, M. M. Mechanisms of stenosis after arterial injury. **Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 49, n. 2, p. 208–15, ago. 1983.

COPPOCK, D. et al. Regulation of the quiescence-induced genes: quiescin Q6, decorin, and ribosomal protein S29. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, n. 2, p. 604–10, 16 mar. 2000.

COPPOCK, D. L.; CINA-POPPE, D.; GILLERAN, S. The quiescin Q6 gene (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: thioredoxin and ERV1. **Genomics**, v. 54, n. 3, p. 460–8, 15 dez. 1998.

COPPOCK, D. L. D. L. et al. Preferential Gene Expression in Quiescent Human Lung Fibroblast. **Cell Growth & Differentiation**, v. 4, n. June, p. 483–493, 1993.

COPPOCK, D. L.; THORPE, C.; LIEBERT, M. A. Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, n. 3-4, p. 300–11, 2006.

DE ANDRADE, C. R. et al. Quiescin sulfhydryl oxidase (QSOX) is expressed in the human atheroma core: possible role in apoptosis. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 47, n. 10, p. 716–27, dez. 2011.

DEPUYDT, M.; MESSENS, J.; COLLET, J.-F. How proteins form disulfide bonds. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 1, p. 49–66, 1 jul. 2011.

EKHOLM, S. V.; ZICKERT, P.; REED, S. I. Accumulation of Cyclin E Is Not a Prerequisite for Passage through the Restriction Point. **Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 9, p. 3256–3265, 2001.

FERNANDES, D. C. et al. Protein disulfide isomerase overexpression in vascular smooth muscle cells induces spontaneous preemptive NADPH oxidase activation and Nox1 mRNA expression: effects of nitrosothiol exposure. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 484, n. 2, p. 197–204, 15 abr. 2009.

FOMENKO, D. E.; GLADYSHEV, V. N. Comparative genomics of thiol oxidoreductases reveals widespread and essential functions of thiol-based redox control of cellular processes. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 16, n. 3, p. 193–201, 1 fev. 2012.

GLAUDEMANS, A. W. J. M. et al. Molecular imaging in atherosclerosis. **European Journal Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 37, n. 12, p. 2381–97, dez. 2010.

GRÜNTZIG, A.; SCHNEIDER, H. J. [The percutaneous dilatation of chronic coronary stenoses--experiments and morphology]. **Sch Med Wach**, v. 107, n. 44, p. 1588, 5 nov. 1977.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 16, p. 1685–95, 21 abr. 2005.

HAYASHI, K. et al. Changes in the balance of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (Akt) and the mitogen-activated protein kinases (ERK/p38MAPK) determine a phenotype of visceral and vascular smooth muscle cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 145, n. 4, p. 727–40, 17 maio 1999.

HECKLER, E. J. et al. Generating disulfides with the Quiescin-sulfhydryl oxidases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, n. 4, p. 567–77, abr. 2008a.

HECKLER, E. J. et al. Human quiescin-sulfhydryl oxidase, QSOX1: probing internal redox steps by mutagenesis. **Biochemistry**, v. 47, n. 17, p. 4955–63, 29 abr. 2008b.

HELLEBREKERS, D. M. E. I. et al. Identification of epigenetically silenced genes in tumor endothelial cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 9, p. 4138–48, 1 maio 2007.

HENSLEY, K. et al. REACTIVE OXYGEN SPECIES, CELL SIGNALING, AND CELL INJURY. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n. 10, p. 1449–50, 15 maio 2000.

HOOBER, K. L. Sulfhydryl Oxidase from Egg White. A FACILE CATALYST FOR DISULFIDE BOND FORMATION IN PROTEINS AND PEPTIDES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 32, p. 22147–22150, 6 ago. 1999.

HOOBER, K. L. K. L. et al. A Sulfhydryl Oxidase from Chicken Egg White. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 48, p. 30510–30516, 29 nov. 1996.

HOOBER, K. L.; THORPE, C. Egg white sulfhydryl oxidase: kinetic mechanism of the catalysis of disulfide bond formation. **Biochemistry**, v. 38, n. 10, p. 3211–7, 9 mar. 1999.

HUBBARD, S. R.; MOHAMMADI, M.; SCHLESSINGER, J. Autoregulatory Mechanisms in Protein-tyrosine Kinases. **J Biol Chem**, v. 273, n. 20, p. 11987–11990, 15 maio 1998.

HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 225–36, 27 jan. 1995.

ILANI, T. et al. A secreted disulfide catalyst controls extracellular matrix composition and function. **Science**, v. 341, n. 6141, p. 74–6, 5 jul. 2013.

ISRAEL, B. A et al. Disulfide bond generation in mammalian blood serum: detection and purification of quiescin-sulfhydryl oxidase. **Free radical biology & medicine**, v. 69, p. 129–35, 25 abr. 2014.

JAJE, J. et al. A Flavin-dependent Sulfhydryl Oxidase in bovine milk. **Biochemistry**, v. 46, n. 45, p. 13031–13040, 2007.

JANISZEWSKI, M. et al. Inhibition of vascular NADH/NADPH oxidase activity by thiol reagents: lack of correlation with cellular glutathione redox status. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, n. 9, p. 889–99, 1 nov. 2000.

JANISZEWSKI, M. et al. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 49, p. 40813–9, 9 dez. 2005.

KATCHMAN, B. A et al. Quiescin sulfhydryl oxidase 1 promotes invasion of pancreatic tumor cells mediated by matrix metalloproteinases. **Molecular Cancer Research**, v. 9, n. 12, p. 1621–31, dez. 2011.

KODALI, V. K.; THORPE, C. Oxidative protein folding and the Quiescin-sulfhydryl oxidase family of flavoproteins. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, n. 8, p. 1217–30, out. 2010.

LASSÈGUE, B.; SAN MARTÍN, A.; GRIENDLING, K. K. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. **Circulation Research**, v. 110, n. 10, p. 1364–90, 11 maio 2012.

LEE, M. Y. et al. Mechanisms of vascular smooth muscle NADPH oxidase 1 (Nox1) contribution to injury-induced neointimal formation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 29, n. 4, p. 480–7, abr. 2009.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 141, n. 7, p. 1117–1134, 2010.

LI, Y. et al. Stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor by hepatopoietin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 48, p. 37443–7, 1 dez. 2000.

LIBBY, P. Managing the risk of atherosclerosis: the role of high-density lipoprotein. **American Journal Cardiology**, v. 88, n. 12A, p. 3N–8N, 20 dez. 2001.

LIMOR-WAISBERG, K.; BEN-DOR, S.; FASS, D. Diversification of quiescin sulfhydryl oxidase in a preserved framework for redox relay. **BMC evolutionary biology**, v. 13, n. 1, p. 70, jan. 2013.

LIN, F.-Y. et al. Endotoxin Induces Toll-Like Receptor 4 Expression in Vascular Smooth Muscle Cells via NADPH Oxidase Activation and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 12, p. 2630–7, dez. 2006.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153–66, mar. 2009.

MANNICK, J. B.; SCHONHOFF, C. M. NO means no and yes: regulation of cell signaling by protein nitrosylation. **Free Radical Research**, v. 38, n. 1, p. 1–7, jan. 2004.

MATSUBA, S. et al. Sulfhydryl oxidase (SOx) from mouse epidermis: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of recombinant protein in the cultured cells. **Journal of Dermatological science**, v. 30, n. 1, p. 50–62, out. 2002.

MCCUBREY, J. A et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1773, n. 8, p. 1263–84, ago. 2007.

MEBAZAA, A. et al. Unbiased plasma proteomics for novel diagnostic biomarkers in cardiovascular disease: identification of quiescin Q6 as a candidate biomarker of acutely decompensated heart failure. **European Heart journal**, v. 33, n. 18, p. 2317–24, set. 2012.

MOREL, C. et al. Involvement of sulfhydryl oxidase QSOX1 in the protection of cells against oxidative stress-induced apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 313, n. 19, p. 3971–82, nov. 2007.

MORISHITA, R. et al. Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 18, p. 8474–8, 15 set. 1993.

MULLER, D. W. The role of proto-oncogenes in coronary restenosis. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 40, n. 2, p. 117–28, 1997.

MUSARD, J. F. et al. Identification and expression of a new sulfhydryl oxidase SOx-3 during the cell cycle and the estrus cycle in uterine cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 287, n. 1, p. 83–91, 14 set. 2001.

NAKATANI, M. et al. Mechanisms of restenosis after coronary intervention: difference between plain old balloon angioplasty and stenting. **Cardiovascular Pathology**, v. 12, n. 1, p. 40–8, 2003.

NIKOL, S.; HUEHNS, T. Y.; HÖFLING, B. Molecular biology and post-angioplasty restenosis. **Atherosclerosis**, v. 123, n. 1-2, p. 17–31, jun. 1996.

NOFER, J.-R.; BRODDE, M. F.; KEHREL, B. E. High-density lipoproteins, platelets and the pathogenesis of atherosclerosis. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 37, n. 7, p. 726–35, jul. 2010.

OSTROWSKI, M. C.; KISTLER, M. K.; KISTLER, W. S. Purification and Cell-free Seminal Vesicle Secretion Synthesis of a Major Protein from Rat. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 2, p. 383–390, 1979.

OSTROWSKI, M. C.; KISTLER, W. S. Properties of a flavoprotein sulfhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion. **Biochemistry**, v. 19, n. 12, p. 2639–45, jun. 1980.

OWENS, G. K. G.; KUMAR, M. M. S.; WAMHOFF, B. R. Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease PLAYS A KEY ROLE IN A NUMBER OF. **Physiological Reviews**, v. 84, p. 767–801, 2004.

PARDEE, A. B. A Restriction Point for Control of Normal Animal Cell Proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 71, n. 4, p. 1286–1290, 1974.

PORTES, K. F. et al. Tissue distribution of quiescin Q6/sulfhydryl oxidase (QSOX) in developing mouse. **Journal of Molecular Histology**, v. 39, n. 2, p. 217–25, abr. 2008.

RADOM, J. et al. Identification and expression of a new splicing variant of FAD-sulfhydryl oxidase in adult rat brain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1759, n. 5, p. 225–33, maio 2006.

RAJE, S.; GLYNN, N. M.; THORPE, C. A continuous fluorescence assay for sulfhydryl oxidase. **Analytical Biochemistry**, v. 307, n. 2, p. 266–72, 15 ago. 2002.

RANCY, P. C.; THORPE, C. Oxidative Protein Folding in vitro: a Study of the Cooperation between Quiescin-sulfhydryl Oxidase and Protein Disulfide Isomerase. **Biochemistry**, v. 47, n. 46, p. 12047–12056, 18 nov. 2010.

REDDY, K. B.; HOWE, P. H. Transforming growth factor beta 1-mediated inhibition of smooth muscle cell proliferation is associated with a late G1 cell cycle arrest. **Journal of Cellular Physiology**, v. 156, n. 1, p. 48–55, jul. 1993.

SCHWARTZ, C. J. et al. The pathogenesis of atherosclerosis: an overview. **Clinical Cardiology**, v. 14, n. 2 Suppl 1, p. I1–16, fev. 1991.

SCHWARTZ, S. M.; CAMPBELL, G. R.; CAMPBELL, J. H. Replication of smooth muscle cells in vascular disease. **Circulation Research**, v. 58, n. 4, p. 427–444, 1 abr. 1986.

SEVIER, C. S. Erv2 and quiescin sulfhydryl oxidases: Erv-domain enzymes associated with the secretory pathway. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 16, n. 8, p. 800–8, 15 abr. 2012.

SEVIER, C. S.; KAISER, C. A.; LIEBERT, M. A. Conservation and diversity of the cellular disulfide bond formation pathways. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 5-6, p. 797–811, 2006.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Development**, v. 13, p. 1501–1512, 1999.

SHI, N.; CHEN, S.-Y. Mechanisms simultaneously regulate smooth muscle proliferation and differentiation. **Journal of Biomedical Research**, v. 28, n. 1, p. 40–46, jan. 2014.

SIMPER, D. et al. Comparative proteomics profiling reveals role of smooth muscle progenitors in extracellular matrix production. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 7, p. 1325–32, jul. 2010.

SOUZA, H. P. S. et al. VASCULAR OXIDANT STRESS EARLY AFTER BALLOON INJURY: EVIDENCE FOR INCREASED NAD(P)H OXIDOREDUCTASE ACTIVITY. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n. 8, p. 1232–1242, 2000.

STOUFFER, G. A; OWENS, G. K. TGF-beta promotes proliferation of cultured SMC via both PDGF-AA-dependent and PDGF-AA-independent mechanisms. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 5, p. 2048–55, maio 1994.

STRAUSS, B. H. et al. Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis. **Circulation Research**, v. 75, n. 4, p. 650–658, 1 out. 1994.

SUNDARESAN, M. et al. Requirement for Generation of H₂O₂ for Platelet-Derived growth factor signal transduction. **Science**, v. 1288, n. 1993, 1995a.

SUNDARESAN, M. et al. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. **Science**, v. 270, n. 5234, p. 296–9, out. 1995b.

SUWANABOL, P. A et al. Transforming growth factor- β increases vascular smooth muscle cell proliferation through the Smad3 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinases pathways. **Journal of Vascular Surgery**, v. 56, n. 2, p. 446–54, ago. 2012.

SZOCS, K. Upregulation of Nox-Based NAD(P)H Oxidases in Restenosis After Carotid Injury. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, n. 1, p. 21–27, 1 jan. 2002.

TERADA, L. S. Specificity in reactive oxidant signaling: think globally, act locally. **The Journal of cell biology**, v. 174, n. 5, p. 615–23, 28 ago. 2006.

THORPE, C. et al. Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 405, n. 1, p. 1–12, 1 set. 2002.

THORPE, C.; COPPOCK, D. L. Generating disulfides in multicellular organisms: emerging roles for a new flavoprotein family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 19, p. 13929–33, 11 maio 2007.

TSAI, S. et al. TGF-beta through Smad3 signaling stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. **American Journal of Physiology**, v. 297, n. 2, p. H540–9, ago. 2009.

TULIS, D. A. Histological and Morphometric Analyses for Rat Carotid Artery Balloon Injury Studies. **Methods Molecular Medicine**, v. 139, p. 31–66, jan. 2007.

TULIS, D. A. Rat carotid artery balloon injury model. **Methods Molecular Medicine**, v. 139, p. 1–30, jan. 2008.

UEHARA, T. et al. S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 513–7, 25 maio 2006.

WEDEMEYER, W. J. et al. Current Topics Disulfide Bonds and Protein Folding †. **Biochemistry**, v. 39, n. 15, 2000.

WITTKE, I. et al. Neuroblastoma-Derived Sulfhydryl Oxidase , a New Member of the Sulfhydryl Oxidase / Quiescin6 Family , Regulates Sensitization to Interferon γ - Induced Cell Death in Human Neuroblastoma Cells. **Cancer Research**, v. 63, p. 7742–7752, 2003.

ZANATA, S. M. et al. High levels of active quiescin Q6 sulfhydryl oxidase (QSOX) are selectively present in fetal serum. **Redox Report: Communications in Free Radical Research**, v. 10, n. 6, p. 319–23, jan. 2005.

ZARGHAM, R. Preventing restenosis after angioplasty: a multistage approach. **Clinical science**, v. 114, n. 4, p. 257–64, fev. 2008.

8. ANEXO – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

8.1 De novo galectin-3 expression influences the response of melanoma cells to isatin-Schiff base copper (II) complex-induced oxidative stimulus.

8.2 Antioxidant properties of glutamine and its role in VEGF-Akt pathways in portal hypertension gastropathy.